

**Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
Stiftung des bürgerlichen Rechts**

D I S S E R T A T I O N

Endothelzellmigration

**Identifizierung von Stimulanzen und Inhibitoren der
Endothelzellmigration und Charakterisierung daran beteiligter
Mechanismen der Signaltransduktion**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)**

**vorgelegt der
Medizinischen Fakultät Charité
Humboldt-Universität zu Berlin**

**von
Frau Anne Bungenstock
aus Xanten**

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. E. Fleck**
- 2. Prof. Dr. rer. nat. M. Hecker**
- 3. PD Dr. rer. nat. B. Fisslthaler**

Datum der Promotion: 02.10.2003

Abstract

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from the preexisting vasculature, is a process involved in physiologic conditions, such as embryonic development and wound-healing, as well as in pathologic conditions, such as diabetic retinopathy and growth and spreading of solid tumors. Chronic inflammation such as atherosclerosis and rheumatoid arthritis is also associated with angiogenic processes.

Angiogenesis is a tightly regulated process that requires migration, proliferation and differentiation of endothelial cells. Cell migration is a very important biologic function of the endothelial cell.

The aim of this study was therefore to investigate the impact of various cytokines on endothelial cell migration and to characterize the chemotactic signal transduction pathways involved in this process.

Leptin, the product of the ob-gene, proved to be a potent stimulus of endothelial cell migration. The activation of the protein kinases ERK-MAPK and Akt is critical for endothelial cell migration, and their pharmacological inhibition caused a significant down-regulation of the migratory response towards migration factors such as Leptin and VEGF.

The antidiabetic thiazolidinediones Troglitazone and Ciglitazone inhibited the leptin-induced endothelial cell migration by interfering with the cytosolic protein kinase Akt. They did not exert any influence on the activation of the ERK-MAPK.

These findings prove the existence of two different, independent ways of signal transduction involved in endothelial cell migration: The ERK-MAPK and the protein kinase Akt. The activation of either kinase is necessary, but not sufficient to induce a migratory response in human endothelial cells.

The proinflammatory mediators $\text{TNF}\alpha$ and CD40L caused a significant inhibition of endothelial cell migration in response to VEGF, when they were added to the culture medium for 24 h. $\text{TNF}\alpha$ did not stimulate the migration of endothelial cells, even when administered during a comparable short period of 5 h. This observation is in contrast with the postulated association of inflammatory and angiogenic processes.

In conclusion, the results of this study show for the first time a direct inhibition of leptin-induced endothelial cell migration by antidiabetic drugs belonging to the PPAR γ -ligand-family through their inhibitory effect on Akt. This possibly broadens the spectrum of therapeutic applications of the antidiabetic thiazolidinediones in patients suffering from NIDDM and secondary complications such as diabetic retinopathy.

Keywords:

Endothelial Cell Migration, Leptin, PPAR γ -Ligands, CD40L

Zusammenfassung

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehender Vaskulatur, ist ein Prozeß, der sowohl unter physiologischen Bedingungen abläuft, wie bei der Embryonalentwicklung und der Wundheilung, als auch unter pathologischen Bedingungen, wie der diabetischen Retinopathie und dem Wachstum und der Metastasierung solider Tumoren. Chronische Entzündungen wie die Atherosklerose und die Rheumatoide Arthritis gehen ebenfalls mit angiogenetischen Prozessen einher.

Die Angiogenese ist ein stark regulierter Vorgang, der Migration, Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen erfordert. Die Fähigkeit zur Migration ist eine wichtige biologische Funktion der Endothelzellen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Untersuchung der Einflüsse verschiedener Zytokine auf die Endothelzellmigration und in der Charakterisierung daran beteiligter Mechanismen der Signaltransduktion.

Dabei erwies sich Leptin als ein potenter Stimulus der Endothelzellmigration. Die Migration endothelialer Zellen nach Stimulation mit chemotaktischen Faktoren wie Leptin und VEGF wird durch die Aktivierung der Proteinkinasen ERK-MAPK und Akt vermittelt, deren pharmakologische Inhibition eine signifikante Hemmung der Migration bewirkte.

Die antidiabetischen Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone hemmten die Leptin-induzierte Endothelzellmigration durch die Inhibition der Proteinkinase Akt, hatten aber keinen Einfluß auf die Aktivierung der ERK-MAP-Kinase.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die ERK-MAP-Kinase und die Proteinkinase Akt zwei voneinander unabhängige Wege der Signaltransduktion darstellen, deren jeweilige Aktivierung für die Migration von Endothelzellen erforderlich, aber nicht ausreichend ist.

Die proinflammatorischen Mediatoren $\text{TNF}\alpha$ und CD40L hemmten die VEGF-induzierte Migration humaner Endothelzellen bei Inkubation der untersuchten Zellen über 24 h signifikant. Auch bei kurzzeitiger Stimulation über 5 h steigerte $\text{TNF}\alpha$ die Rate migrierter Endothelzellen nicht. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur angenommenen Assoziation entzündlicher und angiogenetischer Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, daß Antidiabetika aus der Gruppe der $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden die Endothelzellmigration direkt hemmen. Dies weist auf eine mögliche Erweiterung des therapeutischen Einsatzes der Thiazolidinedione bei Patienten mit NIDDM und sekundären Symptomen wie der diabetischen Retinopathie hin.

Schlagwörter:

Endothelzellmigration, Leptin, $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden, CD40L

Vorwort

Le matin du 16 avril, le docteur Bernard Rieux sortit de son cabinet et buta sur un rat mort, au milieu du palier. Sur le moment, il écarta la bête sans y prendre garde et descendit l'escalier. Mais, arrivé dans la rue, la pensée lui vint que ce rat n'était pas à sa place et il retourna sur ses pas pour avertir le concierge. Devant la réaction du vieux M. Michel, il sentit mieux ce que sa découverte avait d'insolite. La présence de ce rat mort lui avait paru seulement bizarre tandis que, pour le concierge, elle constituait un scandale. La position de ce dernier était d'ailleurs catégorique: il n'y avait pas de rats dans la maison. Le docteur eut beau l'assurer qu'il y en avait un sur le palier du premier étage, et probablement mort, la conviction de M. Michel restait entière. Il n'y avait pas de rats dans la maison, il fallait donc qu'on eût apporté celui-ci du dehors. Bref, il s'agissait d'une farce.

Albert Camus, La Peste (1947)

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem:

PD Dr. med. Michael Gräfe: für die engagierte Betreuung der Arbeit und zuverlässige Online-Hilfen.

PD Dr. med. Stephan Götze: für sein Engagement, gute Ideen und unerschütterlichen Optimismus, durch die die Versuche aus ihrer Stagnation befreit wurden und auch größere Katastrophen die Fertigstellung dieser Arbeit nicht verhindern konnten.

Chantel Spencer-Hänsch: für die emotionale und materielle Unterstützung im oft harten Laboralltag.

Den Kreißsaal-Teams des Virchow-Klinikums und des Martin-Luther-Krankenhauses: für die Bereitstellung ungezählter Nabelschnüre.

Prof. Dr. med. E. Fleck: für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Meinen ehemaligen Lehrern Dr. Langenberg und Roswitha Dickmann: ohne deren Mathematikunterricht und Physik-Leistungskurs ich nie den Weg zur Medizin gefunden hätte.

Meinen Eltern und meinem Bruder Leif: für geduldiges Zuhören, gute Ratschläge und ihre uneingeschränkte Unterstützung und Rückendeckung während des Studiums.

und Marcel Hagelüken

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1 Methoden	3
2.1.1 Isolierung von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	3
2.1.2 Vitalitätsbestimmung und Zellzählung	6
2.1.3 Isolierung von CD40L-positiven Lymphozyten	6
2.1.4 Migrationsassay	7
2.1.5 FACS-Analyse	8
2.1.6 Western Blot	9
2.1.7 Statistik	10
2.2 Materialliste	11
3. Ergebnisse	15
3.1 Nachweis der Endothelzellen in der Zellkultur	15
3.2 Etablierung eines Migrationassays für HUVEC	15
3.2.1 Einflüsse der Kulturbedingungen auf das Migrationsverhalten von HUVEC	15
3.2.2 Migration bei Stimulation durch a-FGF und durch FCS	15
3.2.3 Dosisabhängigkeit der durch a-FGF induzierten Endothelzellmigration	17
3.2.4 Hemmung der durch a-FGF induzierten Endothelzellmigration durch PD 98059	17
3.2.5 Hemmung der durch 20% FCS induzierten Endothelzellmigration durch PD 98059	20
3.3 Einfluß von VEGF auf die Endothelzellmigration	23
3.3.1 Migration der Endothelzellen nach Stimulation mit VEGF	23
3.3.2 PD 98059 hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	23
3.3.3 VEGF induziert eine transiente Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen	25
3.3.4 PD 98059 hemmt die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch VEGF	27
3.4 Einfluß von Leptin auf die Endothelzellmigration	29
3.4.1 Leptin stimuliert die Endothelzellmigration	29
3.4.2 PD 98059 hemmt die Leptin-induzierte Endothelzellmigration	29

3.4.3	Leptin bewirkt eine transiente Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen	33
3.4.4	PD 98059 hemmt die Leptin-induzierte Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen in Endothelzellen	34
3.4.5	Thiazolidinedione hemmen die Leptin-induzierte Endothelzellmigration	35
3.4.6	Thiazolidinedione haben keinen Einfluß auf die Leptin-stimulierte Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen	35
3.4.7	Wortmannin hemmt die Leptin-induzierte Endothelzellmigration	38
3.4.8	Leptin aktiviert die Proteinkinase Akt in Endothelzellen	38
3.4.9	Wortmannin hemmt die Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Leptin	40
3.4.10	Thiazolidinedione hemmen die Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Leptin	40
3.4.11	PD 98059 hat keinen Einfluß auf die Aktivierung von Akt durch Leptin	42
3.5	Inhibitoren der Endothelzellmigration	45
3.5.1	TNF α hat keine promigratorische Wirkung auf Endothelzellen	45
3.5.2	24h-Stimulation mit TNF α hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	45
3.5.3	24h-Stimulation mit CD40L hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	47
4.	Diskussion	51
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.2	Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus	51
4.3	Etablierung eines Migrationsassays für humane umbilikale Endothelzellen und Definition eines Versuchsmediums	55
4.4	Einfluß von VEGF auf die Endothelzellmigration	57
4.4.1	Biologische Wirkungen von VEGF	57
4.4.2	ERK1/2-MAPK-abhängige Induktion der Endothelzellmigration durch VEGF	60
4.5	Einfluß von Leptin auf die Endothelzellmigration	62
4.5.1	Biologische Wirkungen von Leptin	62
4.5.2	Leptin stimuliert die Endothelzellmigration über eine Aktivierung der Proteinkinasen ERK1/2-MAPK und Akt	64
4.6	Einfluß der Thiazolidinedione auf die Endothelzellmigration	65
4.6.1	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors	65
4.6.2	Biologische Wirkungen von PPAR γ	66
4.6.3	Thiazolidinedione hemmen die Leptin-induzierte Endothelzellmigration durch Inhibition der Proteinkinase Akt	67
4.7	Inhibitoren der Endothelzellmigration	70
4.7.1	Biologische Wirkungen von TNF α	70
4.7.2	TNF α ist kein Stimulus der Endothelzellmigration	71
4.7.3	Biologische Wirkungen von CD40-CD40L	73

4.7.4 CD40L ist kein Stimulus der Endothelzellmigration	74
5. Zusammenfassung	77

Abbildungsverzeichnis

2.1	Präparation einer Nabelschnur	4
3.1	Einfluß von a-FGF und FCS auf die Migration von HUVEC	16
3.2	Migration bei Stimulation mit a-FGF bzw. 20 % FCS	18
3.3	Konzentrationsreihe a-FGF	19
3.4	PD 98059 hemmt die durch a-FGF induzierte Endothelzellmigration . . .	21
3.5	PD 98059 hemmt die durch 20% FCS induzierte Endothelzellmigration .	22
3.6	VEGF stimuliert die Endothelzellmigration	24
3.7	PD 98059 hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	26
3.8	Kinetik der MAPK-Aktivierung durch VEGF	27
3.9	PD 98059 hemmt die VEGF-induzierte Aktivierung der ERK1/2-MAPK	28
3.10	Leptin stimuliert die Endothelzellmigration	30
3.11	PD 98059 hemmt die durch Leptin induzierte Endothelzellmigration . . .	32
3.12	Leptin aktiviert die ERK1/2-MAPK	33
3.13	PD 98059 hemmt die Aktivierung der ERK1/2-MAPK durch Leptin . . .	34
3.14	Thiazolidinedione hemmen die durch Leptin induzierte Endothelzellmi- gration	36
3.15	Thiazolidinedione hemmen nicht die Aktivierung der ERK1/2-MAPK durch Leptin	37
3.16	Wortmannin hemmt die durch Leptin induzierte Endothelzellmigration .	39
3.17	Aktivierung der Akt durch Leptin	40
3.18	Wortmannin hemmt die Aktivierung der Akt durch Leptin	41
3.19	Thiazolidinedione hemmen die Aktivierung der Akt durch Leptin	43
3.20	PD 98059 hemmt nicht die Aktivierung der Akt durch Leptin	44
3.21	TNF α stimuliert nicht die Endothelzellmigration	46
3.22	TNF α hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	48
3.23	CD40L hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration	50

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
EcNOS	Endothelial Cell Nitric Oxid Synthetase
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK1	Extracellular Signal-regulated Kinase 1
ERK2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor a (acidic) ; b (basic)
Flt-1	fms-like Tyrosine Kinase = VEGF-R 1
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
KDR	Kinase-insert Domain-containing Receptor = VEGF-R 2
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LT	Lymphotoxin
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	Map-Kinase-Kinase
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Matrix Metalloproteinase
NIDDM	Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
NO	Nitric Oxide
NOS	NO Synthase
OB-R	Leptin-Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphatpuffer
PD-ECGF	Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PlGF	Placenta-derived Growth Factor
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	PPAR Response Element
RXR	9-cis Retinoic Acid Receptor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TH1	T1-Helferzellen
TNF α	Tumor Necrosis Factor
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TRAF	TNF-related Activation Factor
TRAP-1	TNF-related Activation Protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u-PA	Urokinase-like Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehender Vaskulatur, ist ein Prozeß, der sowohl unter physiologischen Bedingungen abläuft, wie bei der Embryonalentwicklung, der Wundheilung oder der Ovulation, als auch unter pathologischen Bedingungen, wie der Atherosklerose, der diabetischen Retinopathie oder beim Wachstum und der Metastasierung der meisten soliden Tumoren [73, 50, 52, 164]. Chronische Entzündungen wie die Rheumatoide Arthritis [149, 84], und die Atherosklerose [10, 223], gehen ebenfalls mit angiogenetischen Prozessen einher, und so wurde der Begriff der „Angiogenetischen Erkrankungen“ für pathologische Veränderungen eingeführt, bei denen es zu einer abnormalen Vaskularisierung der betroffenen Gewebe kommt [51].

Die Voraussetzung für angiogenetische Vorgänge ist der geregelte Ablauf verschiedener Prozesse, die das die Gefäßwände auskleidende Endothel einbeziehen [111].

Im Einzelnen sind zur Bildung neuer Blutgefäße Migration, Proliferation und erneute Differenzierung der Endothelzellen einschließlich der Produktion und Freisetzung der Bestandteile einer neuen Basalmembran erforderlich [28]. Dabei verfügen Endothelzellen über alle Informationen zur Bildung neuer Netzwerke aus Blutgefäßen [50].

Die Fähigkeit zur Migration ist eine wichtige Funktion der Endothelzellen und läßt sich wiederum in verschiedene einzelne Vorgänge unterteilen [75]. An erster Stelle steht das Gleichgewicht zwischen Adhäsion und Deadhäsion, das so verschoben wird, daß die Endothelzellen sich aus ihrem Zellverband lösen können. Eine weitere Voraussetzung der Endothelzellmigration besteht in der Invasivität der Endothelzellen, ihrer Fähigkeit also, die Basalmembran durch Freisetzung von Matrixmetalloproteasen zu degradieren. Schließlich sind auch die Motilität der Endothelzellen und die Anwesenheit von Chemokinen erforderlich, die die Migration der Endothelzellen anregen und steuern [173, 188]. Eine ganze Reihe von Chemokinen für humane Endothelzellen wurde bereits beschrieben: So ist bekannt, daß a-Fibroblast Growth Factor (a-FGF), b-Fibroblast Growth Factor (b-FGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Endothelzellmigration stimulieren [164].

Zur Erlangung der Motilität ist die Aktivierung und Reorganisation des Zytoskeletts aus Aktin und Myosin von entscheidender Bedeutung [75].

Auch über die Mechanismen der Signaltransduktion, die zur Migration von Endothelzellen führen, existiert eine Vielzahl von Publikationen, und so wird beispielsweise die Aktivierung der Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase (ERK-MAP-Kinase) als ein Schlüsselmechanismus bei der Migration vaskulärer

und nicht-vaskulärer Zellen angesehen [68, 167, 195]. Darüber hinaus wurde die zytosolische Proteinkinase Akt als entscheidend für die VEGF-induzierte Migration von Endothelzellen beschrieben [138].

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, den Einfluß verschiedener Zytokine auf die Endothelzellmigration zu untersuchen und die daran beteiligten Wege der Signaltransduktion näher zu charakterisieren.

Dabei gab es zwei Schwerpunkte: Zum einen die Untersuchung der Effekte von Leptin, eines von Adipozyten sezernierten Zytokins, dessen Blutspiegel bei Patienten mit Metabolischem Syndrom ständig erhöht sind [125, 182, 222], auf die Endothelzellmigration. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang die Identifizierung zweier voneinander unabhängiger Wege der Signaltransduktion, die beide eine entscheidende Rolle bei der Endothelzellmigration einnehmen. Außerdem wurde der Einfluß der antidiabetischen Thiazolidinedione auf die Leptin-induzierte Endothelzellmigration untersucht.

Da bekannt ist, daß chronische Entzündungen wie die Rheumatoide Arthritis [149], und die Atherosklerose [10, 223] mit angiogenetischen Prozessen einhergehen, wurde zum anderen die Wirkung zweier Entzündungsmediatoren aus der Tumor Necrosis Factor- (TNF-) Liganden-Familie, $\text{TNF}\alpha$ und CD40L, auf die Migration humaner Endothelzellen als einem entscheidenden Schritt der Angiogenese untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Isolierung von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Präparation

Die HUVEC wurden enzymatisch nach der durch E. A. Jaffe [96] und M. Gräfe [80, 79] modifizierten Methode nach Maruyama [129] aus der Nabelschnurvene gelöst.

Dazu wurde eine Nabelschnur an beiden Enden mit Nabelklemmen abgeklemmt, so daß das Innere steril blieb, und bis zu 48 h in Phosphate Buffered Saline (PBS) + 1% Penicillin/ Streptomycin gelagert. Nach äußerlicher Reinigung und Desinfektion wurde die Nabelschnur an beiden Enden mit einem sterilen Einmalskalpell durchtrennt. An einer Seite wurde die Vene aufgesucht und mit einer Kanüle sondiert. Die Kanüle wurde mit einer OP-Klemme fixiert. Dann wurde die Nabelschnur in einen Stativständer eingehängt. Es folgten zweimaliges Spülen der Vene mit 20 ml PBS, um Blutreste zu entfernen, und das Einfüllen von 10 ml Dispase (2,4 U/ml). Das untere Ende der Nabelschnur wurde mit einer Kocherklemme verschlossen. Nach 30 min. Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Nabelschnur wiederum äußerlich gereinigt und desinfiziert und mit einer sterilen Mullkompressen massiert, um die HUVEC von der Venenwand zu lösen. Die Nabelschnur wurde wieder in den Stativständer eingehängt und das untere Ende steril abgetrennt. Die Dispase mit den abgelösten HUVEC wurde mit einem sterilen 45ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen und die Vene ein letztes Mal mit Medium 199 Earle durchspült, um weitere HUVEC abzulösen. Nach 5 min. Zentrifugieren bei 250 g (1200 U/ min) wurde der Überstand entfernt. Im Zellpellet befanden sich die HUVEC, die nun in Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche gegeben wurden. Die Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau bei der enzymatischen Gewinnung von HUVEC.

Zellkultur

Für die Zellkultur wurden entweder sterile Einmalartikel oder im Autoklaven hitzesterilisierte Glaspipetten verwendet. Die HUVEC wurden in T75-Kulturflaschen kultiviert, die über Nacht bei 4°C mit 0,2% Gelatine (in H₂O) beschichtet worden waren. Alle zwei

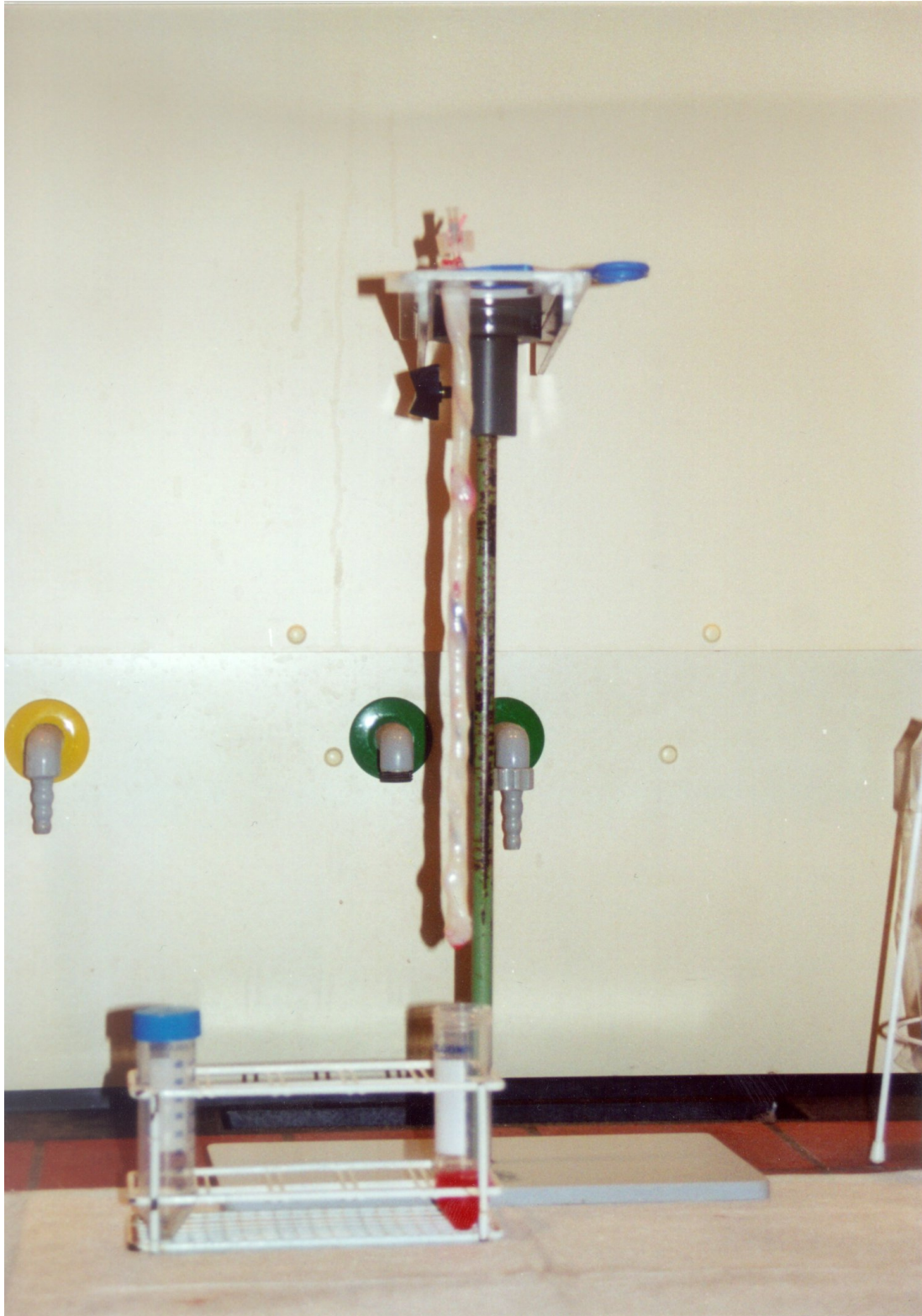


Abbildung 2.1: Präparation einer Nabelschnur

Tage wurden die ca. 8 ml Medium pro Kulturflasche nach mikroskopischer Kontrolle der Zellkultur ausgetauscht.

Bei Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die HUVEC auf drei neue T75-Kulturflaschen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt. Dann wurde mit 8 ml PBS w/o Ca^{2+} gespült. Danach erfolgte eine weitere Spülung mit 8 ml PBS w/o Ca^{2+} + Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Zur Ablösung der HUVEC wurden 2 ml Trypsin/ EDTA (0,05% / 0,02% in PBS w/o Ca^{2+} in die Kulturflasche gegeben. Nach ca. 1 min. war die Ablösung der HUVEC makro- und mikroskopisch zu erkennen, und die abgelösten HUVEC wurden mit einer Glaspipette aufgenommen und zusammen mit 2 ml Medium in ein steriles Falcon-Röhrchen gegeben. Nach 5 min. Zentrifugieren bei 250 g (1200 U/ min) wurde der Medium/Trypsin-Überstand abgesaugt, und die HUVEC wurden in Medium resuspendiert und auf die neuen Kulturflaschen aufgeteilt.

Medium

Für die HUVEC wurde folgendes Nährmedium verwandt:

Medium 199 Earle mit:

- 20 % FCS
- 1% L-Glutamin (200 mM)
- 1% Penicillin/ Streptomycin/ Hepes (P./S./H.) (Konzentrationen im Medium: 100 U/ml P.; 100 µg/ml S.; 10 mM H.)
- 0,1% α -Fibroblast Growth Factor (FGF) (Konzentrationen im Medium: 10 ng/ml α -FGF; 5 U/ml Heparin)

Charakterisierung der Endothelzellen

Die HUVEC wurden enzymatisch aus humanen Nabelschnurvenen gewonnen. Bei dieser Art der Zellisolierung ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß andere als Endothelzellen gewonnen werden, wenn die Basalmembran nicht durch zu lange Inkubation mit Dispase oder mechanisch zerstört wurde. Durch Spülen mit PBS am Tag nach der Zellisolierung wurden nicht adhärierende Zellen, vor allem Erythrozyten, entfernt.

Die HUVEC wiesen die für Endothelzellen charakteristischen strukturellen Merkmale auf: Sie stellten sich im Lichtmikroskop als große polygonale, "pflastersteinartige" Zellen dar, die streng einschichtig wuchsen [96].

Zur immunologischen Charakterisierung als Endothelzellen wurden die HUVEC mit einem Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII) gefärbt. Dabei machte man sich die Tatsache zunutze, daß der vWF nur von Endothelzellen (und Megakaryozyten) exprimiert wird [97, 172].

2.1.2 Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

Mit der Vitalitätsbestimmung ist die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen möglich. Dieser Schritt wurde zusammen mit der Zellzählung durchgeführt.

Dazu zentrifugierte man die Zellen 5 min. bei 250 g und resuspendierte sie in einem definierten Volumen an Medium. Man entnahm eine Probe von 50 µl aus diesem Volumen und gab 200 µl 0,25%iges Trypanblau (in H₂O) dazu. Nach einer Wartezeit von ca. 1 min erfolgte die Zellzählung mit Hilfe der Neubauerschen Zählkammer. Dazu zählte man 8 x 16 Felder aus und errechnete das arithmetische Mittel. Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (5x) und dem Faktor 10000 ergab die Zellzahl pro ml Medium. Dabei erschienen die vitalen Zellen gleichmäßig rund und hell. Die Zellmembran intakter Endothelzellen ist für Trypanblau impermeabel. Abgestorbene Zellen erschienen dagegen entrundet und blau angefärbt.

2.1.3 Isolierung von CD40L-positiven Lymphozyten

Gewinnung

Wir verwendeten CD40-Ligand-positive T-Lymphozyten, die uns von Prof. Dr. R. Kroczyk vom Robert Koch-Institut Berlin großzügig zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen entstammten einer Myeloma-Zelllinie und waren mit dem CD40-Liganden stabil transfiziert. (P3xTBA7) Zum Vergleich wurden nicht transfizierte T-Lymphozyten verwendet, die den CD40-Liganden nicht exprimierten. (P3xWT)

Zellkultur

Die nicht-adhärenierenden Myeloma-Zellen wurden in T75-Kulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte die makro- und mikroskopische Kontrolle der Zellproliferation und im Anschluß daran der Mediumwechsel. Dazu wurde ein Großteil des Mediums mit den darin enthaltenen Zellen unter sterilen Bedingungen abgesaugt und schließlich mit Medium auf das ursprüngliche Volumen (ca. 20 ml) aufgefüllt. Einmal pro Woche wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche passagiert, um das Kontaminationsrisiko möglichst gering zu halten. Dazu entnahm man ein geringes Volumen an Medium (ca. 5-10 ml) mit den darin enthaltenen Zellen und füllte es in eine frische Kulturflasche. Wiederum wurde mit Medium aufgefüllt. Die P3xTBA7-Zellen (Transfektanten) wurden durch Zugabe von Geneticin in einer Konzentration von 200 µg/ml (Medium) zum Kulturmedium selektiert.

Medium

Für die Kultur der Myeloma-Zellen wurde folgendes Medium benutzt:

Medium RMPI 1640 (w L-Glutamin)

- + 10% FCS
- + 1% P/S (100 U/ml P.; 100 µg/ml S.)

Den transfizierten P3xTBA7-Zellen (CD40L-positiv) wurde zusätzlich noch das zyto-statisch wirkende Geneticin zugesetzt (200 µg/ml), das eine Vermehrung von Zellen verhinderte, die den CD40L nicht mehr exprimierten. Damit wurde eine Selektion der transfizierten Zellen bewirkt.

Fixierung

Aus der Kulturflasche wurde eine Probe entnommen, die darin enthaltenen Zellen mit 0,25% Trypanblau angefärbt und die Zellzahl im Medium mit Hilfe der Neubauerschen Zählkammer bestimmt. Anschließend entnahm man ein der gewünschten Zellzahl ent-sprechendes Volumen der Kulturflasche. Die Lymphozyten wurden in einer Endkonzentration von 200000/cm² Endothelzellen verwendet. Durch 5 min. Zentrifugieren bei 250 g trennte man die Zellen vom Medium. Die Lymphozyten wurden schließlich in 500 µl PBS/200000 Zellen resuspendiert. Dazu pipettierte man 500 µl 2% Paraformaldehyd in PBS /200000 Zellen, also das gleiche Volumen wie zuvor an PBS. Nach gutem Durchmischen wurden die Falcon-Röhrchen sofort für 2-3 min auf Eis gestellt. In diesem Schritt erfolgte die Fixierung der Lymphozyten. Nach Entfernen des Paraformaldehyds durch erneutes Herunterzentrifugieren schloß sich dreimaliges Waschen mit PBS an, wozu die Zellen jedesmal resuspendiert und anschließend wieder herunterzentrifugiert wurden. In einem letzten Schritt resuspendierte man die fixierten Lymphozyten (P3xWT oder P3xTBA7) in HUVEC-Medium. Mit den fixierten Lymphozyten wurden konfluente HU-VEC in T25-Kulturflaschen für 24 h inkubiert.

TRAP-1

TRAP-1, ein monoklonaler Antikörper gegen den CD40L, wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml auf die fixierten P3xTBA7-Zellen gegeben. Man inkubierte die Zellen 15 min. bei Raumtemperatur mit dem Antikörper, bevor man sie auf die Endothelzellen gab.

2.1.4 Migrationsassay

Der Versuchsaufbau bestand in einer modifizierten Boyden-Chamber [26].

In sterile 24-Well-Platten (Falcon #3074) wurden sterile Cell Culture Inserts (Falcon #3097) mit einer Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 8,0 µm ein-gehängt. Dadurch entstand ein Zwei-Kammer-System. Zunächst gab man 200 µl Ge-latine (0,2%, in H₂O gelöst) in die obere (innere) und 700 µl Gelatine in die untere (äußere) Kammer. Die Gelatine mußte über Nacht bei 4°C oder 2 h bei 37°C einwirken.

Diese Volumina wurden für jeden Arbeitsschritt im Migrationsversuch verwandt. Dann wurde die Gelatine vorsichtig vollständig abgesaugt. Anschließend erfolgte das Blocken mit 1% Bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS für 1 h bei 37°C. Durch diesen Schritt sollten unspezifische Proteinbindungen, die in der Gelatine enthalten sein könnten, ausgeschaltet werden. Das BSA wurde wiederum vollständig abgesaugt und nun die äußere Kammer mit 700 µl Versuchsmedium (Medium 199 Earle mit 5% FCS ohne L-Glutamin) gefüllt.

Danach wurden HUVEC aus der Kultur entnommen, herunterzentrifugiert und in Versuchsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauerschen Zählkammer bestimmt. Zur Zellzählung in der Neubauerschen Zählkammer wurde eine Probe aus dem die HUVEC enthaltenden Medium entnommen und die Zellen mit 0,25% Trypanblau in H₂O angefärbt. Dann verdünnte man die Lösung so, daß in 200 µl Volumen noch 50000 Zellen enthalten waren. Abschließend erfolgte die Aussaat der HUVEC zu 50000 Zellen/Cell Culture Insert. Die HUVEC mußten mindestens 30 min. bei 37°C adhären. Nach mikroskopischer Kontrolle der Adhäsion am Filterboden begannen die Stimulationsvorgänge [116].

Inhibitoren der Migration wurden in der oberen Kammer zu dem die HUVEC enthaltenden Versuchsmedium addiert. Sie mußten 30 min. bei 37°C auf die Zellen einwirken. Stimulantien der Migration wurden in entsprechender Konzentration in Versuchsmedium angesetzt und ggf. die Inhibitoren der Migration in derselben Konzentration wie in der inneren Kammer hinzugefügt. Zur Stimulation in der äußeren Kammer wurde das Medium durch das die Stimulantien / Inhibitoren enthaltende Medium ausgetauscht. Nach 5 h bei 37°C wurde die Migration gestoppt. Dazu saugte man vorsichtig das gesamte Medium ab, spülte innere und äußere Kammer großzügig mit PBS und reinigte anschließend die Innenseite der Membranen der Cell Culture Inserts mechanisch mit Watteträgern. In einem nächsten Schritt fixierte man die Zellen mit 100%igem kaltem Methanol (-24°C) mindestens 10 min. lang (oder über Nacht) bei -24°C. Nach zweimaligem Spülen beider Kammern mit H₂O erfolgte die Färbung der Zellen mit Mayer's Hämalaun für 10 min. bei Raumtemperatur. Als letzten Schritt spülte man beide Kammern so lange mit H₂O, bis sich keine Farbwolken mehr lösten, in der Regel drei Mal.

Anschließend wurden die gefärbten Zellkerne unter dem Lichtmikroskop bei 50 facher Vergrößerung gezählt; bei dieser geringen Vergrößerung wurde fast die gesamte Membran erfaßt, so daß sich das Auswählen bestimmter Gesichtsfelder erübrigte. Der Rand der Cell Culture Inserts wurde bei der Zellzählung grundsätzlich nicht berücksichtigt, da sich dort wegen der mangelnden mechanischen Reinigung durch die Watteträger in der Regel überproportional viele anhaftende HUVEC befanden.

2.1.5 FACS-Analyse

Mit der FACS-Analyse wurde gesichert, daß die transfizierten P3xTBA7-Zellen tatsächlich den CD40-Liganden exprimierten. Zudem konnte so sichergestellt werden, daß TRAP-1, der spezifische Antikörper gegen den CD40-Liganden, an die HUVEC band.

Dazu wurden HUVEC aus der Kultur entnommen und auf eine Konzentration von 0,5-1 Mio. Zellen in 2 ml Medium verdünnt. In einem ersten Schritt spülte man die HUVEC mit PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} . Dann wurden die Zellen 30-45 min. in einem Volumen von 50 μl (Trap-1 AK 1:100 in PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} + 1% FCS) inkubiert.

Nach erneutem Zentrifugieren und Spülen mit PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} wurden die HUVEC wiederum 30-45 min. in einem Volumen von 50 μl mit einem zweiten Antikörper inkubiert (Cy3 AK 1:100 in PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} + 1% FCS). Schließlich wurden die HUVEC noch einmal zentrifugiert und mit PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} gespült. Danach wurden sie erneut zentrifugiert und in 0,5 ml PBS w Ca^{2+} ; Mg^{2+} + 1% FCS resuspendiert. So konnten sie bei 4°C maximal 3 h aufbewahrt werden, bis die eigentliche FACS-Messung am Durchflußzytometer im DHZB erfolgte.

2.1.6 Western Blot

Zur Analyse der phosphorylierten, aktivierten MAPK, des VEGF-Rezeptors und der Akt wurden HUVEC in 20 cm^2 -Kulturschalen ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden für 30 min. mit PD 98059, einem spezifischen MEK-Inhibitor vorbehandelt; danach erfolgte eine Kostimulation mit PD 98059 und Leptin, $\text{TNF}\alpha$ oder VEGF oder normalem HUVEC-Medium. Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit wurden die Zytokine ohne Vorbehandlung der Zellen eingesetzt. Zur Analyse der Zeitabhängigkeit wurden die Zytokine ohne Vorbehandlung der HUVEC für verschiedene Inkubationszeiten eingesetzt (10-60 min). Bei 24-h-Stimulationen wurden die konfluenten HUVEC für 24 h dem zu untersuchenden Zytokin ($\text{TNF}\alpha$; VEGF) oder fixierten P3xWT- oder P3xTBA7-Zellen ausgesetzt; die kurzfristige Stimulation der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen und schließlich in ebenfalls eisgekühltem Radioimmunoprecipitation-Puffer (RIPA) gelöst (10mM Tris-HCL, pH 7,5; 1% Triton X-100, 0,5% NP 40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 100 μM Na-Orthovanadate, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 10 mg/l Leupeptin). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, in Eppendorf Cups gesammelt und zentrifugiert (1400 UPM, 30 min. bei 4°C). Die Proteinkonzentration wurden mit Hilfe des Bradford Protein Assay (Biorad, San Diego, CA) bestimmt. Gleiche Mengen an Protein (50 μg) wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (7,5% Standardgel) aufgetrennt und mit einem Bio-Rad System auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Unspezifische Bindungen wurden durch 5% Magermilchpulver and 1% Tween 20 in TBS geblockt. Die Membranen wurden 90 min. (oder über Nacht) mit Antikörpern gegen Gesamt-MAPK, phosphorylierte MAPK, VEGF-Rezeptor und Akt in Block-Lösung inkubiert. Schließlich wurden die Blots dreimal für jeweils 15 min. in 1% Tween 20 / TBS gewaschen und anschließend für weitere 90 min. mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach fünffmaligem Waschen mit 1% Tween / TBS erfolgte die Entwicklung, wofür das ECL Western blotting detection-System verwendet wurde. Als Kontrolle für gleiche Proteinkonzentrationen in den MAPK-Experimenten wurden für jede Gruppe zwei Gele parallel beschichtet und auf phosphorylierte, aktivierte MAPK oder Gesamt-MAPK hin

untersucht. Alle Western-Blots wurden mindestens einmal mit weiteren, von der ersten unabhängigen, Zellaufarbeitungen wiederholt.

2.1.7 Statistik

Die folgenden statistischen Verfahren wurden angewandt:

1. arithmetisches Mittel (Mittelwert) = \bar{x}
2. Standardfehler (SF bzw. SE)
3. T-Test (Student's Test) für unverbundene Stichproben mit folgenden Signifikanzniveaus: $P > 0,05$ = nicht signifikant und $P < 0,05$ = signifikant

Die Versuchsergebnisse werden angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. In den Grafiken sind die Signifikanzniveaus durch Symbole angegeben und in einer Legende erörtert [158].

2.2 Materialliste

- Acrylamid, Roth GmbH, Karlsruhe
- A-FGF, 100-17 A, PeproTech, über Tebu GmbH, Frankfurt/ Main
- Akt-Ab, # 9272, New England Biolabs, Beverly, MA
- Albumin, Bovine Fraktion V 7,5% Solution, A 8412, Sigma Chemie GmbH Deisenhofen
- Ammoniumperoxidsulfat, 101200, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Anti-Active MAPK pAb, Rabbit (pTEpY), # V 8031 Promega, Madison, WI
- Anti-Active p38 pAb, Rabbit, # V 1211, Promega, Madison, WI
- Anti-Rabbit IgG, HRP Conjugate, # W 4011, Promega, Madison, WI
- Aqua B. Braun, B. Braun AG, Melsungen
- Autoklav, Webeco, Modell B, über Heinz Schubert GmbH, Berlin
- Bromophenol-Blau, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Brutschrank, CO₂ -Auto Zero, Heraeus GmbH, Hanau
- Cell Culture Inserts, # 3097, Falcon, Heidelberg
- Ciglitazone, 74772-77-3, Biomol
- Collagen A, seromed, L 7220, Biochrom KG, Berlin
- Combitips (verschiedene Volumina), Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
- Conical Tubes 15 ml, # 2097 Falcon, Heidelberg
- Conical Tubes 50 ml, # 2070 Falcon, Heidelberg
- Cy3 Anti-Mouse Ab, 115-166-072, Dianova GmbH
- Dispase, 2,4 U/ml, 295825 Boehringer, Mannheim
- DMSO (Dimethylsulfoxid), 102951, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Durchflußzytometer, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
- ECL Western Blot Analysis System, RPN 2108, Batch 70, Amersham Pharmacia Biotech
- Einmalskalpell, PFM AG, Köln
- 10ml-Einmalspritzen, B. Braun AG, Melsungen
- 20ml-Einmalspritzen, B. Braun AG, Melsungen
- ECL Detection Kit, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

- EDTA (Ethyldiamintetraacetat), E 5134, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Einmalfilterhalter Rotrand, 0,2 µM, FP 030/3, Schleicher Schuell
- ELISA-Reader, DIAS
- Eppendorf Cups, 2 ml, 296938121, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
- FCS (Fetal Calf Serum), S 0215, res. Charge 675S, Biochrom KG, Berlin
- Fibronectin, L 7117, Boehringer, Mannheim
- Gelatine, G 9391, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Geneticin, 1464981, Boehringer, Mannheim
- Gewebekulturflaschen T25, 690175, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturflaschen T75, 658175, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Glutamin (L-Glutamin 200 mM), G 7513, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Glycin, 3908.2, Roth GmbH, Karlsruhe
- HCl, 13386, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Heparansulfat, H4777, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Heparin, H 5640, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Hepes, H 3375, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Igelpal CA-630, I-3021, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Kocherklemmen,
- Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim
- Laminar Flow Faster, über Schmid Laborbedarf, Berlin
- Laminin, 1243217, Boehringer, Mannheim
- Leptin, L 4146, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Mayer´s Hämalunlösung, 109249, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Medium 199 Earle, seromed, F 0615, Biochrom KG, Berlin
- Medium RMPI 1640, seromed, FG 1215, Biochrom KG, Berlin
- 2-Mercapto-Ethanol, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Methanol, 6012, E. Merck, Darmstadt
- Mikroskop: Axiovert 10, Zeiss, Oberkochen
- 24-Multiwell Platten, # 3047, Falcon, Heidelberg
- 96-Multiwell-Platten, # 167008, Nunc, Wiesbaden

- Nabelklemmen, Scandi Care, Anderstorp, Schweden
- Nalgene Einmalfilter 150 ml, 155-0020, Nalgene
- NaOH, 106498, E. Merck, Darmstadt
- Neubauer Zählkammer, Brand/ Wertheim
- Nitrocellulose, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- OP-Klemmen (Plastik),
- Paraformaldehyd, 818715, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- Pasteurpipetten, ungestopft, 9411020, Brand GmbH, Wertheim
- Pasteurpipetten mit Wattebausch, 3151102, Hilgenberg/ Germany
- PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , L 182-10, Biochrom KG, Berlin
- PBS w Ca^{2+} , Mg^{2+} , L 1815, Biochrom KG, Berlin
- PD 98059, 513000-S, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
- Phospho-Akt (Ser 473) 4E2 Monoclonal Ab, # 9276 S, New England Biolabs, Beverly, MA
- P 44/42 MAPK Ab, # 9102, New England Biolabs, Beverly, MA
- Penicillin Grünenthal 10 Mega, Nr. 755929, Grünenthal GmbH, Stolberg
- Ponceau-Konzentrat, 114275, E. Merck KGaG, Darmstadt
- 2- Propanol 70%, B. Braun AG, Melsungen
- P / S (Penicillin/ Streptomycin), A-2213, Biochrom KG, Berlin
- Röntgenfilme, Kodak
- SDS (Sodiumdodecylsulfat), Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- Serologische Pipetten 10ml, P 94010, TPP
- Serologische Pipetten 25ml, 70373 Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Sodiumdeoxycholate, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
- Stativständer ,
- Tank-Blot von BIORAD Laboratories GmbH, München
- $\text{TNF}\alpha$, 300-01 A, PeproTech, über Tebu GmbH, Frankfurt/ Main
- Toluidinblau, 115930, E. Merck KGaG, Darmstadt
- TRAP-1 ,
- Tris, 819623, ICN, Aurora/ Ohio
- Troglitazone ,

- Trypanblau, 111732, E. Merck KGaG, Darmstadt
- Trypsin/ EDTA, L 2143, Biochrom KG, Berlin
- Tween 20, 822184, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- VEGF, 100-20, PeproTech, über Tebu GmbH, Frankfurt/ Main
- Venenverweilkanüle Venflon TM, 1.0 x 32 mm, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
- Vernichtungsbeutel Plastibrand, #759705 Brand GmbH, Wertheim
- Wägepapier, 370117217, Neo-Lab
- Wattestäbchen (Q-Tips), 300.301, Tawamed
- Zentrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Endothelzellen in der Zellkultur

Die Isolierung und Kultivierung der humanen umbilikalen Endothelzellen erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. Als Kontrolle diente der typische mikroskopische Aspekt eines Pflastersteinreliefs der Zellkulturen. Um sicher zu sein, daß ausschließlich Endothelzellen für die Versuche verwendet wurden, wurden die Zellkulturen auf die Expression spezifischer endothelialer Marker untersucht. So wurde auf allen untersuchten Zellkulturen die Expression des Faktor-VIII-related-Antigens und von CD 31 nachgewiesen, beides spezifische Marker für Endothelzellen.

3.2 Etablierung eines Migrationassays für HUVEC

3.2.1 Einflüsse der Kulturbedingungen auf das Migrationsverhalten von HUVEC

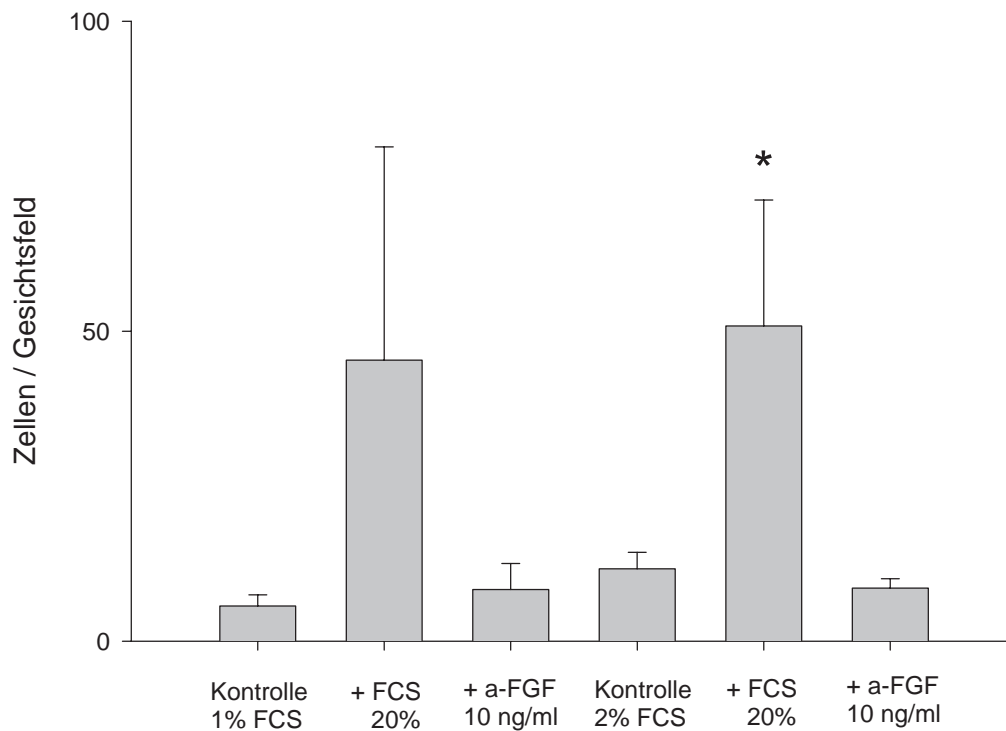
Zunächst wurden Migrationsversuche mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluß der im Kulturmedium enthaltenen proliferationsfördernden Faktoren Fetal Calf Serum (FCS) und a-FGF auf das Migrationsverhalten der HUVEC zu untersuchen.

Dazu wurden die HUVEC, abweichend von allen weiteren Versuchen, in nur 1% bzw. 2% FCS enthaltendem Kulturmedium resuspendiert. Die Migration wurde durch Zugabe von 20% FCS-haltigem Medium in die untere Kammer stimuliert. In einem zweiten Ansatz wurde der Einfluß von a-FGF auf die Migration durch Zugabe von 10 ng/ml a-FGF in die untere Kammer untersucht. Sowohl FCS als auch a-FGF wurden somit in den Konzentrationen zur Stimulation verwendet, in denen sie auch im üblichen Kulturmedium enthalten waren. Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug n=3.

Das Ergebnis dieser Migrationsversuche ist in der Abbildung [3.1](#) dargestellt.

3.2.2 Migration bei Stimulation durch a-FGF und durch FCS

Im Folgenden wurde derselbe Versuch wiederholt, dabei wurden aber die humanen Endothelzellen in einem Versuchsmedium resuspendiert, das 5% FCS enthielt (siehe Abb. [3.2](#)).



* = $p < 0,05$ vs Kontrolle 2% FCS

Abbildung 3.1: **Einfluß von a-FGF und FCS auf die Migration von HUVEC**

In dieser Abbildung ist der Einfluß von FCS und a-FGF auf die Migration humaner umbilikaler Endothelzellen dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Zellen nur auf minimalem Niveau durch den Filter der modifizierten Boyden-Chamber migriert sind. Bei Verwendung von 1% FCS enthaltendem Versuchsmedium migrierten im Mittel $5,67 \pm 1,80$ Zellen durch den Filter, bei 2% FCS enthaltendem Medium waren es $11,67 \pm 2,67$. Durch vierstündige Inkubation mit 20% FCS enthaltendem Kulturmedium wurde die Migration nur sehr unzuverlässig gesteigert; es ergaben sich große Schwankungen. So migrierten bei Verwendung von Medium mit 1% FCS und Zugabe von 20% FCS im Schnitt $45,33 \pm 34,39$ HUVEC durch den Filter. Erst bei Verwendung von 2% FCS enthaltendem Kulturmedium induzierte die Inkubation der Endothelzellen mit 20% FCS eine signifikante Steigerung der Zahl migrierter Zellen auf $50,83 \pm 20,32$ ($p < 0,05$). Durch Zugabe von a-FGF in einer Konzentration von 10 ng/ml konnte keine signifikante Zunahme der migrierten Endothelzellen bewirkt werden.

Bei den nicht stimulierten Endothelzellen waren $43,4 \pm 11,32$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert. Stimulation mit 10 ng/ml a-FGF bewirkte eine Migration von $86 \pm 13,5$, Stimulation mit 20% FCS eine Migration von $160,68 \pm 38,14$ Zellen pro Gesichtsfeld. Es ergab sich eine signifikante Steigerung der Endothelzellmigration um den Faktor 1,98 bei Stimulation mit a-FGF ($p < 0,05$) bzw. um den Faktor 3,70 bei Stimulation mit FCS ($p < 0,05$). Die Anzahl der Versuche betrug $n=3$.

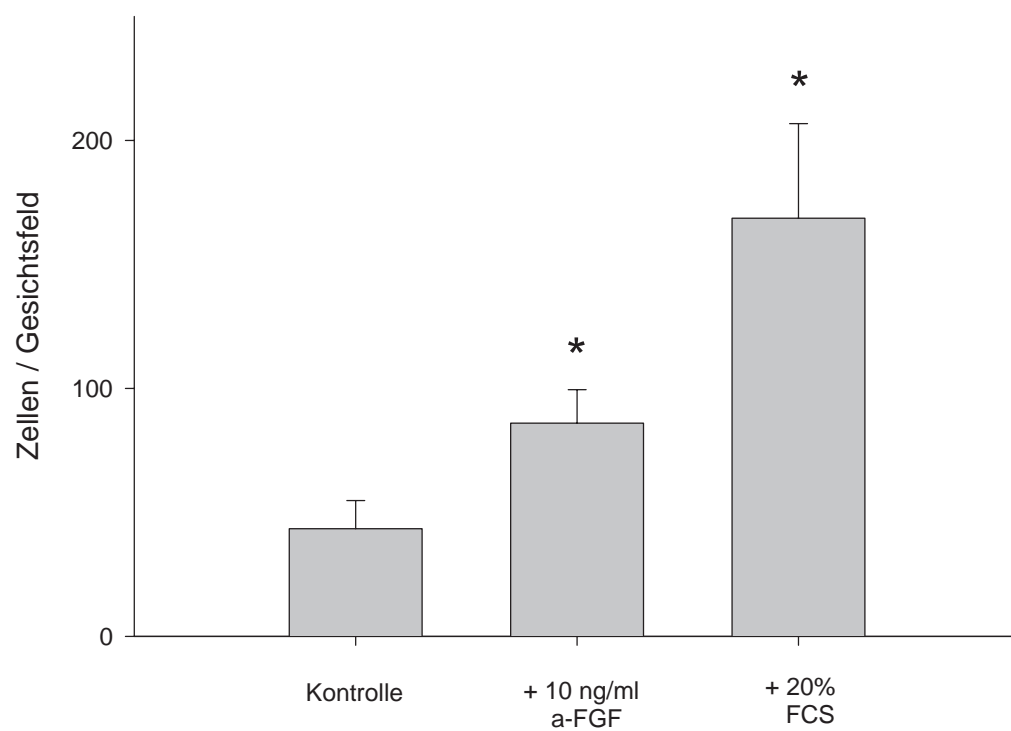
3.2.3 Dosisabhängigkeit der durch a-FGF induzierten Endothelzellmigration

Im Folgenden wurde untersucht, ob die promigratorische Wirkung von a-FGF dosisabhängig erfolgt. Dazu wurden Migrationsversuche durchgeführt, bei denen die HUVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen von a-FGF über einen Bereich von 0,1 ng/ml bis 50 ng/ml stimuliert wurden. Es zeigte sich eine deutliche Dosisabhängigkeit der a-FGF-induzierten Endothelzellmigration mit einem Maximum bei 10 ng/ml a-FGF. Gegenüber der Kontrolle, wo je Gesichtsfeld im Schnitt $74,0 \pm 11,03$ Zellen durch den Filter gewandert waren, migrierten nach Stimulation mit 10 ng/ml a-FGF im Mittel $105,33 \pm 21,36$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung der Migration um den Faktor 1,42 ($p < 0,05$).

Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=3$. Die Abbildung 3.3 stellt das beschriebene Ergebnis dar.

3.2.4 Hemmung der durch a-FGF induzierten Endothelzellmigration durch PD 98059

Um zu untersuchen, ob die ERK-MAP Kinase an der Signaltransduktion bei der durch a-FGF induzierten Migration der humanen umbilikalen Endothelzellen beteiligt ist, wurde die Stimulation mit 10 ng/ml a-FGF wiederholt, diesmal jedoch mit zusätzlicher Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor (MAP Kinase Kinase-Inhibitor) PD 98059 in einer Konzentration von 30 μ M. Durch Stimulation mit 10 ng/ml a-FGF ergab sich wiederum eine signifikante Steigerung der Endothelzellmigration im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen der Kontrolle. Bei den nicht stimulierten HUVEC waren $33,25 \pm 9,26$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter migriert, bei den mit a-FGF stimulierten HUVEC betrug die Anzahl der pro Gesichtsfeld migrierten Zellen $76,75 \pm 19,51$. Dies entspricht einer signifikanten Zunahme um den Faktor 2,31 ($p < 0,05$). Durch Koinkubation mit dem MEK-Inhibitor PD 98059 in einer Konzentration von 30 μ M wurde die durch a-FGF induzierte Endothelzellmigration auf im Mittel $14,63 \pm 4,21$ Zellen pro Gesichtsfeld reduziert. Damit ergibt sich eine signifikante Hemmung der Endothelzellmigration durch PD 98059 um 100% im Vergleich zur Migration nach a-FGF-Stimulation ($p < 0,01$). Der spezifische MEK-Inhibitor PD 98059 hat also in einer Konzentration von 30 μ M die migrationssteigernde Wirkung von a-FGF komplett aufgehoben. Eine zytotoxische Wirkung von PD 98059 auf die HUVEC, die sich etwa durch die Ablösung der adhären-



* = $p < 0,05$ vs Kontrolle

Abbildung 3.2: **Migration bei Stimulation mit a-FGF bzw. 20 % FCS**

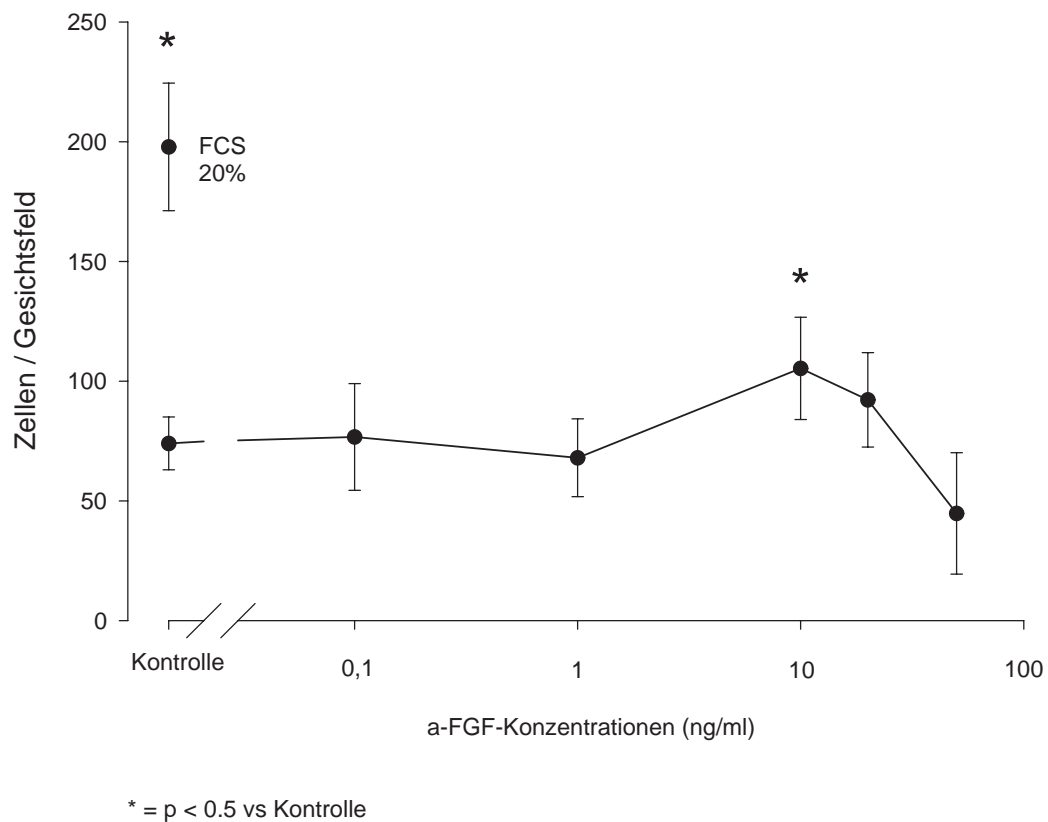


Abbildung 3.3: **Konzentrationsreihe a-FGF**

Die Grafik zeigt die Dosisabhängigkeit der durch Stimulation mit a-FGF induzierten Endothelzellmigration. In einer Konzentration von 10 ng/ml bewirkt a-FGF eine maximale und gegenüber der Kontrolle signifikante Steigerung der Migration.

Zellen von der Membran der Migrationsfilter oder durch eine Anfärbbarkeit der Endothelzellen mit Trypan-Blau manifestiert hätte, wurde nicht beobachtet.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=4$. Die aufgeführten Daten sind in der Abbildung 3.4 dargestellt.

3.2.5 Hemmung der durch 20% FCS induzierten Endothelzellmigration durch PD 98059

In einem weiteren Migrationsversuch wurde der Einfluß des spezifischen MEK-Inhibitors PD 98059 auf die durch 20% FCS induzierte Migration der HUVEC untersucht.

Dazu erfolgte eine Koinkubation mit 20% FCS und 30 μM PD 98059 für die Dauer der Migration. Bei den unbehandelten Zellen waren im Mittel $26,4 \pm 5,62$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert. Nach Stimulierung durch 20% FCS in der unteren Kammer waren dagegen $139,45 \pm 31,02$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer gewandert. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung um den Faktor 5,28 ($p < 0,01$).

Nach der Koinkubation mit PD 98059 in einer Konzentration von 30 μM waren dagegen nur noch $51,15 \pm 13,78$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert. Damit ergibt sich eine signifikante Hemmung der FCS-induzierten Endothelzellmigration um 78,1% ($p < 0,05$). Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine zytotoxische Wirkung von PD 98059 in einer Konzentration von 30 μM . Die Endothelzellen hatten sich während der Koinkubation nicht vom Filter der modifizierten Boyden-Kammer abgelöst. Die Zellen waren nicht mit Trypan-Blau anfärbbar.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=10$. In der Abbildung 3.5 sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt.

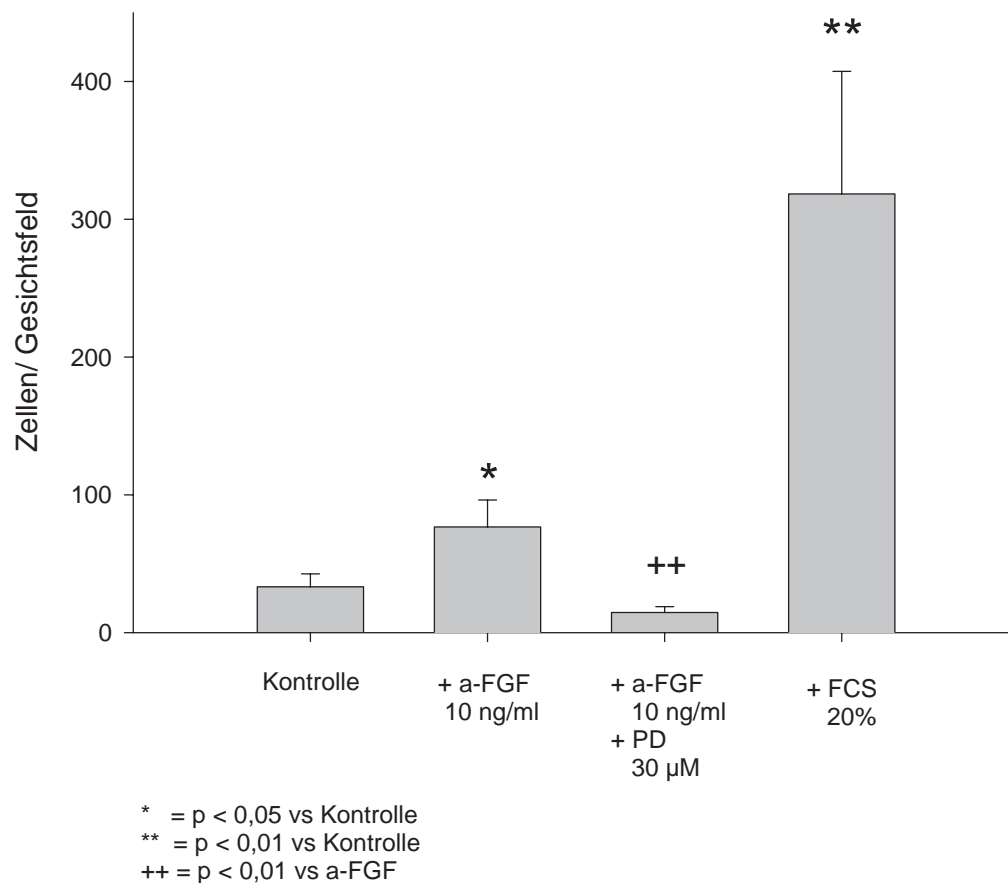


Abbildung 3.4: **PD 98059 hemmt die durch a-FGF induzierte Endothelzellmigration**

In dieser Abbildung ist zu erkennen, daß durch Koninkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 der promigratorische Effekt von a-FGF komplett aufgehoben wird. Nach Koinkubation mit PD und a-FGF migrieren weniger Zellen als völlig unbehandelte Zellen in der Kontrolle. Die Stimulation mit 20% FCS in der letzten Säule des Diagramms dient als Positivkontrolle für die erhaltene Fähigkeit der Endothelzellen zur Migration.

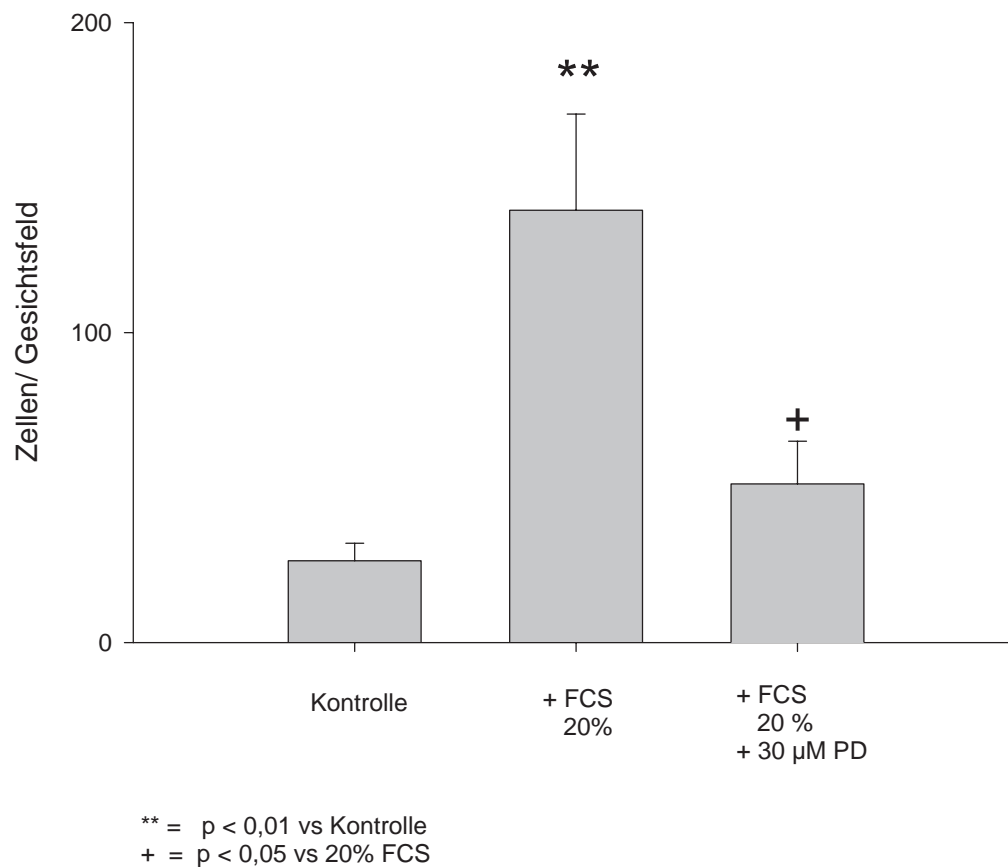


Abbildung 3.5: PD 98059 hemmt die durch 20% FCS induzierte Endothelzellmigration

Die Abbildung zeigt die signifikante Hemmung der promigratorischen Wirkung von 20% FCS durch den spezifischen ERK-MAP-Kinase-Inhibitor PD 98059. Es sind jeweils die absoluten Zahlen der pro Gesichtsfeld durch den Filter migrierten Zellen ersichtlich. Nach der deutlichen Steigerung der Endothelzellmigration durch 20% FCS bewirkt eine Koinkubation mit PD 98059 einen starken Rückgang der Migration um 78,1%.

3.3 Einfluß von VEGF auf die Endothelzellmigration

3.3.1 Migration der Endothelzellen nach Stimulation mit VEGF

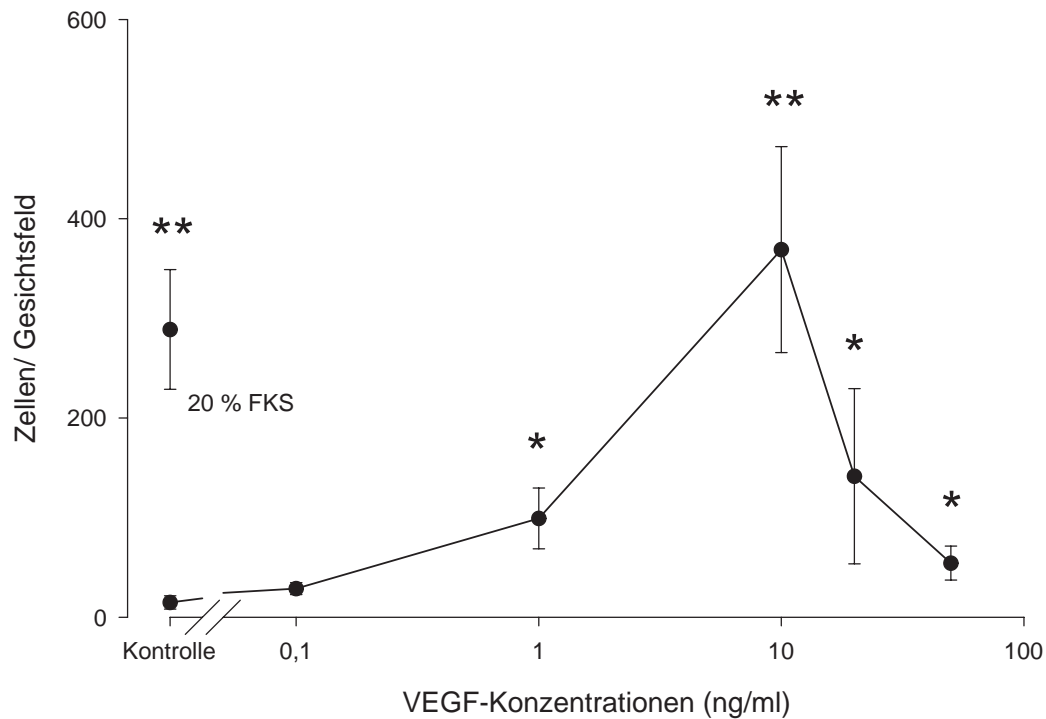
In einem weiteren Migrationsversuch wurde der Einfluß von VEGF auf die Migration von humanen umbilikalen Endothelzellen untersucht. VEGF ist ein heparinbindender Wachstumsfaktor, für den eine wichtige Rolle in der embryonalen Vaskulogenese und in der Angiogenese gezeigt werden konnte [47].

Um nun den Einfluß von VEGF auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen zu untersuchen, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF inkubiert. Unbehandelte Zellen waren nur gering migriert; im Mittel wurden $14,86 \pm 6,68$ Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Bei der Stimulation mit VEGF ergab sich hingegen eine deutliche Steigerung der Migration, die bei einer Konzentration von 1 ng/ml signifikant wurde. Bei dieser VEGF-Konzentration migrierten im Schnitt $99,17 \pm 30,56$ Zellen pro Gesichtsfeld; dies entspricht einem Zuwachs um den Faktor 6,67 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Das Maximum dieses promigratorischen Effekts von VEGF wurde bei einer Konzentration von 10 ng/ml erreicht. Bei dieser Konzentration waren im Mittel $369,0 \pm 103,38$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter gewandert. Damit wurde die Endothelzellmigration um den Faktor 23,83 signifikant gesteigert ($p < 0,01$). Bei noch höherer Dosierung von VEGF ergaben sich immer noch signifikante Steigerungen der Migration im Vergleich zum Kontrollwert. Allerdings konnten die Endothelzellen nicht zu noch stärkerer Migration angeregt werden. Bei 20 ng/ml VEGF waren im Mittel $141,5 \pm 88,0$ Zellen durch den Filter gewandert, was einem Zuwachs um den Faktor 9,52 entspricht ($p < 0,05$). Für 50 ng/ml ergab sich ein Wert von $54,33 \pm 17,10$ Zellen pro Gesichtsfeld und damit ein Zuwachs der Migration um den Faktor 3,66 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

Die Anzahl der mit VEGF durchgeführten Stimulationen betrug $n=4$. In der Abbildung 3.6 werden die oben aufgeführten Ergebnisse dargestellt.

3.3.2 PD 98059 hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration

Um zu untersuchen, ob die ERK1/2- MAP-Kinasen auch an der Signaltransduktion der VEGF-vermittelten Endothelzellmigration beteiligt sind, wurde nun eine Koinkubation von 10 ng/ml VEGF, also der Konzentration mit dem stärksten promigratorischen Effekt, und verschiedenen Konzentrationen von PD 98059 durchgeführt. Wiederum ergab sich eine signifikante Steigerung der Anzahl migrierter Zellen durch VEGF-Stimulation in einer Konzentration von 10 ng/ml. Die Zellzählung ergab im Mittel $474,33 \pm 104,21$ Zellen pro Gesichtsfeld, im Vergleich zu $57,6 \pm 13,12$ bei der Kontrolle ($p < 0,01$). Durch Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 ergab sich eine deutliche Hemmung dieses Effekts. Bei Koinkubation mit 1 μ M PD 98059 waren noch $314,17 \pm 71,75$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer gewandert. Eine Konzentration von 10 μ M PD 98059 dagegen reduzierte die Anzahl je



* = $p < 0,05$ vs Kontrolle
 ** = $p < 0,01$ vs Kontrolle

Abbildung 3.6: **VEGF stimuliert die Endothelzellmigration**

In dieser logarithmischen Darstellung ist die dosisabhängige Steigerung der Endothelzellmigration durch VEGF ersichtlich. Dargestellt ist die Zahl der je Gesichtsfeld migrierten Zellen. Der Zuwachs an migrierten Zellen gegenüber der Kontrolle wird bei 1 ng/ml VEGF signifikant und erreicht sein Maximum bei einer Konzentration von 10 ng/ml VEGF. Links in der Grafik ist der Wert für die Stimulation mit 20 % FCS als Positivkontrolle dargestellt. Es wird deutlich, daß 10 ng/ml VEGF die Endothelzellmigration noch stärker induziert als 20 % FCS. Damit erweist sich VEGF als starker Stimulus der Endothelzellmigration.

Gesichtsfeld migrierter HUVEC auf $172,6 \pm 36,57$. Dies entspricht einer signifikanten Hemmung um 72,4% gegenüber der VEGF-Stimulation ($p < 0,05$). Die maximale Hemmung wurde bei einer Konzentration von 30 μ M PD 98059 erreicht: Hier waren nur noch $89,2 \pm 23,6$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der Boyden-Kammer gewandert. Damit ergibt sich eine signifikante Hemmung um 92,4% gegenüber alleiniger Inkubation mit 10 ng/ml VEGF ($p < 0,01$). 30 μ M PD 98059 waren also in der Lage, den starken promigratorischen Effekt von VEGF nahezu vollständig aufzuheben. Daraus ist zu folgern, daß die ERK1/2-MAP-Kinasen an der Signaltransduktion der VEGF-induzierten Endothelzellmigration beteiligt sind.

Wie bei den vorhergegangenen Koinkubationen von PD 98059 mit a-FGF bzw. 20% FCS ergab sich kein Anhaltspunkt für eine zytotoxische Wirkung von PD 98059 in den getesteten Konzentrationen.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche lag bei $n=3$. Die oben aufgelisteten Ergebnisse werden in der Abbildung 3.7 gezeigt.

3.3.3 VEGF induziert eine transiente Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen

Die Migrationsversuche hatten eine deutliche promigratorische Wirkung von VEGF auf humane umbilikale Endothelzellen gezeigt, die durch den spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 nahezu vollständig aufgehoben wurde. Dies läßt auf eine Beteiligung der ERK1/2-MAP Kinasen bei der Signaltransduktion der VEGF-induzierten Endothelzellmigration schließen.

Um nun die Rolle der ERK1/2-MAP Kinasen bei der VEGF-vermittelten Endothelzellmigration näher zu untersuchen, wurden im Folgenden Western Blots durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation der Endothelzellen mit 10 ng/ml VEGF, der Konzentration mit der stärksten promigratorischen Wirkung, über verschiedene Zeiten. Die Dauer der Stimulation erstreckte sich von 10 min. bis zu 60 min. . Die aktivierten und phosphorylierten ERK1/2-MAP Kinasen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Es zeigte sich eine signifikante und zeitabhängige Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch VEGF mit einem Gipfel nach kurzzeitiger Stimulation. Nach 10 min. Stimulation mit 10 ng/ml VEGF war die Aktivität der ERK1/2-MAP Kinasen um den Faktor 3,55 gegenüber der Kontrolle gesteigert, nach 20 min. noch um den Faktor 2,32, und nach 30 min. um den Faktor 1,63. Nach 45 min. VEGF-Stimulation entsprach die Induktion der ERK1/2-MAP Kinasen nur noch dem Faktor 1,18 gegenüber der Kontrolle, und nach 60 min. war das Niveau der Kontrolle wieder erreicht.

Die Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis dieser Western Blots.

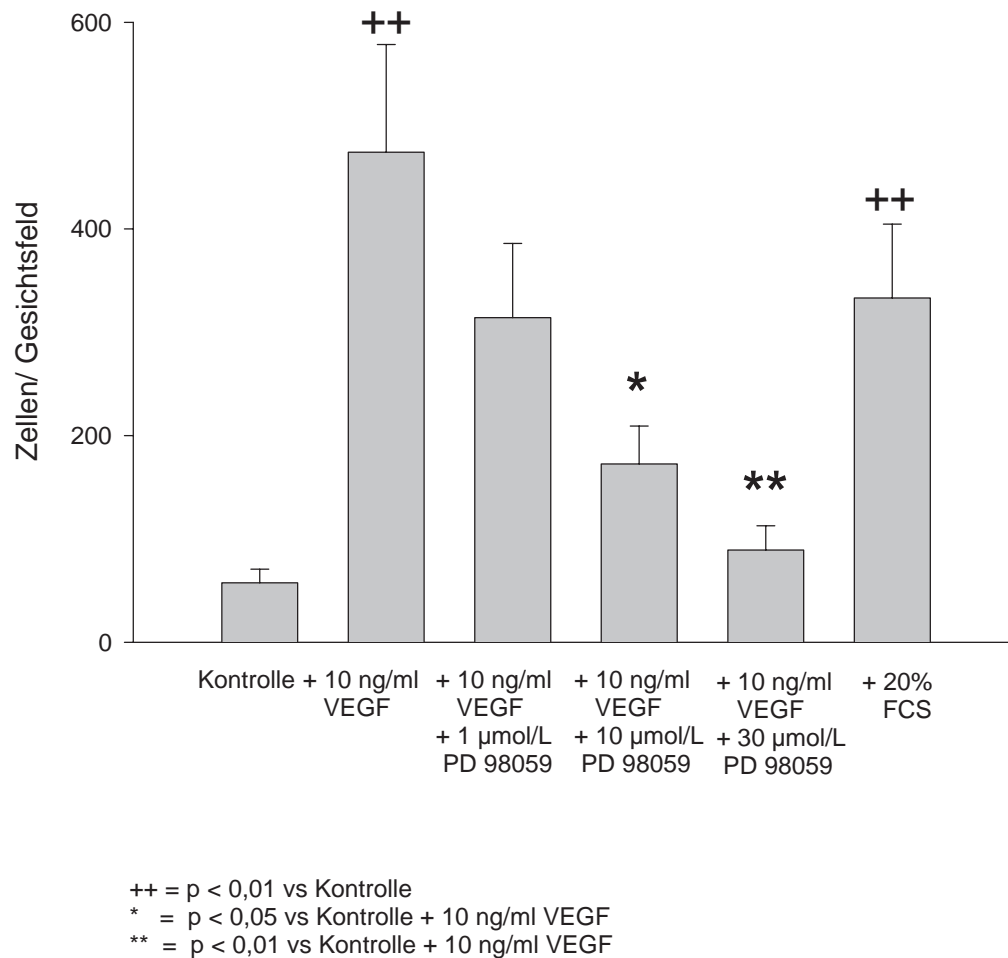


Abbildung 3.7: **PD 98059 hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration**

Die Abbildung zeigt die starke Hemmung des promigratorischen Effekts von VEGF durch den MEK-Inhibitor PD 98059. Auch hier ist VEGF wieder ein noch stärkerer Induktor der Endothelzellmigration als die Positivkontrolle mit 20% FCS. Ein Vergleich der Säulen zeigt, daß 30 µM PD 98059 die VEGF-vermittelte Migration fast vollständig aufhebt und nahezu auf das Niveau der Kontrolle reduziert. Daraus ist zu folgern, daß die ERK1/2-MAP Kinasen in der VEGF-induzierten Endothelzellmigration eine wichtige Rolle spielen.

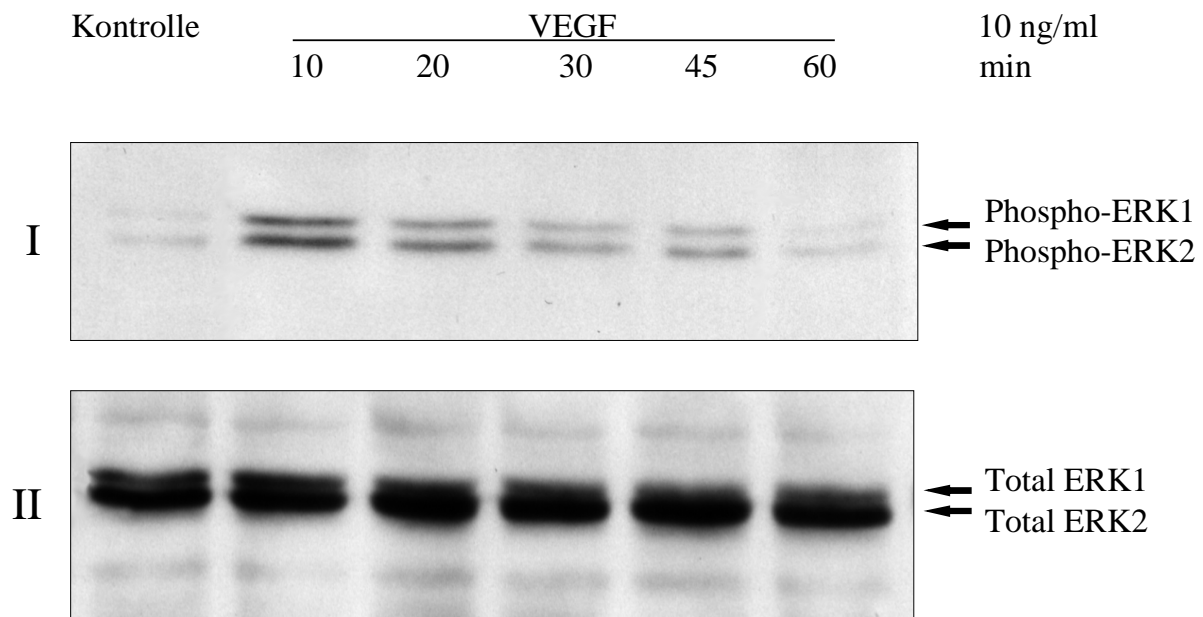


Abbildung 3.8: **Kinetik der MAPK-Aktivierung durch VEGF**

3.3.4 PD 98059 hemmt die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch VEGF

Im Folgenden wurden Western Blots nach 10minütiger Koinkubation der Endothelzellen mit 10 ng/ml VEGF und verschiedenen Konzentrationen von PD 98059 durchgeführt. Wiederum wurden die aktivierten und phosphorylierten ERK1/2-MAP Kinasen durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen.

Bei der Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der ERK1/2-Aktivierung durch Stimulation mit VEGF. 10 ng/ml VEGF steigerte die Aktivität der ERK1/2-MAP Kinasen um den Faktor 3,56 gegenüber der Kontrolle. Die Koinkubation mit 10 μ M PD 98059 hemmte diesen Effekt um 52,44%. Bei einer Koinkubation mit 30 μ M PD 98059 wurde die Phosphorylierung der ERK1/2-MAP Kinasen vollständig aufgehoben; die Hemmung betrug 100%.

Das Ergebnis dieser Western Blots ist in der Abbildung 3.9 dargestellt. Die obere Abbildung I zeigt eine deutliche Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch Stimulation mit 10 ng/ml VEGF. Bei der Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 ist die Hemmung der VEGF-induzierten Aktivierung der MAPK zu erkennen. Man erkennt deutlich die Dosisabhängigkeit dieses inhibitorischen Effekts. Bei der Koinkubation der Endothelzellen mit VEGF und 30 μ M PD 98059 erreicht die Aktivität der ERK1/2-MAP Kinasen das Niveau der Kontrolle. In der unteren Grafik II ist die Gesamtmenge der ERK1/2-MAP Kinasen dargestellt, unabhängig von ihrer Phosphorylierung und damit von ihrem Aktivitätsgrad. Es ist zu erkennen, daß die Expression der MAP Kinasen in Endothelzellen weder durch die Stimulation mit 10 ng/ml noch durch die Koinkubation mit PD 98059 und VEGF beeinflusst wird.

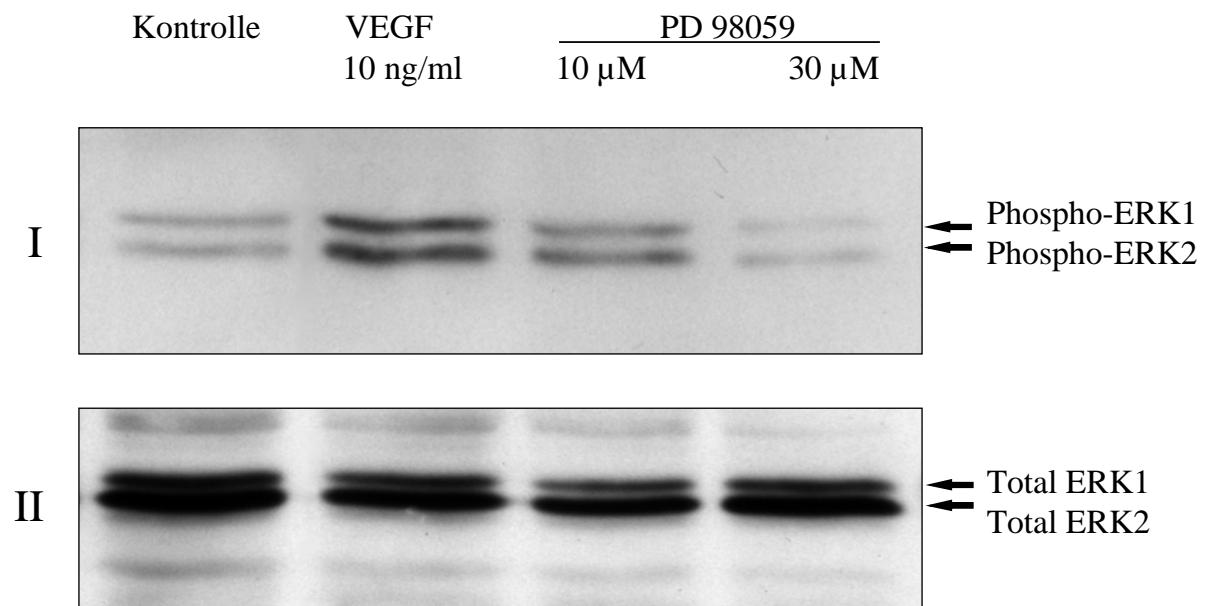


Abbildung 3.9: **PD 98059** hemmt die **VEGF-induzierte Aktivierung der ERK1/2-MAPK**

3.4 Einfluß von Leptin auf die Endothelzellmigration

3.4.1 Leptin stimuliert die Endothelzellmigration

In den folgenden Versuchen wurden der Einfluß von Leptin auf das Migrationsverhalten der humanen umbilikalen Endothelzellen untersucht und wichtige Schritte der Signaltransduktion näher charakterisiert.

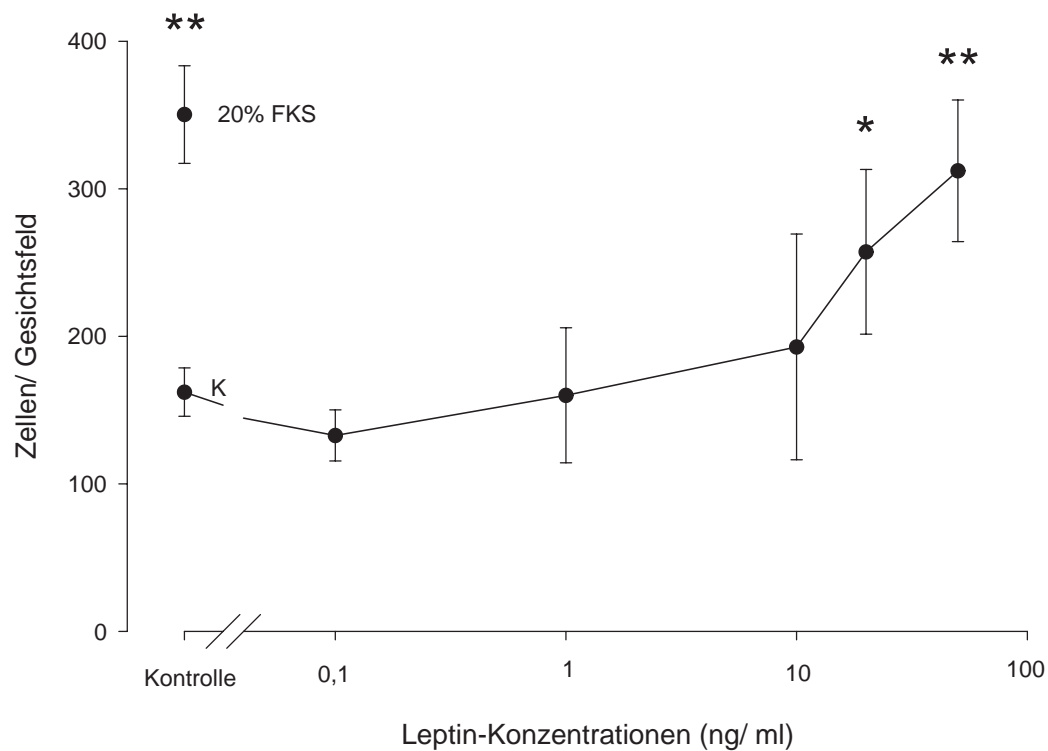
Um den Einfluß von Leptin auf die Endothelzellmigration zu untersuchen, erfolgte zunächst ein Migrationsversuch mit Stimulation der HUVEC durch verschiedene Leptin-Konzentrationen. Dabei konnte ein dosisabhängiger promigratorischer Effekt von Leptin beobachtet werden. Bei den unbehandelten HUVEC waren im Mittel $162,17 \pm 16,45$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter gewandert. Stimulation mit Leptin-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 10 ng/ml hatte keinen signifikanten Effekt auf die Migration: Nach Inkubation mit 0,1 ng/ml Leptin waren im Schnitt $132,80 \pm 17,29$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert, nach Stimulation mit 1 ng/ml Leptin waren es $160,00 \pm 45,76$ und nach Stimulation mit 10 ng/ml Leptin $192,8 \pm 76,51$. Ab einer Leptin-Konzentration von 20 ng/ml konnte jedoch eine signifikante Steigerung der Endothelzellmigration beobachtet werden: Nach Inkubation mit dieser Dosis Leptin migrierten im Mittel $257,25 \pm 55,86$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einem Zuwachs um den Faktor 1,59 ($p < 0,05$). Der maximale promigratorische Effekt wurde bei der höchsten eingesetzten Konzentration gesehen. Nach Stimulation mit 50 ng/ml Leptin migrierten $312,20 \pm 47,99$ Zellen pro Gesichtsfeld. Damit steigerte Leptin in dieser Dosierung die Endothelzellmigration um den Faktor 1,93 gegenüber der Kontrolle ($p < 0,01$). Noch höhere Leptin-Konzentrationen wurden nicht untersucht, da diese die im menschlichen Körper nachgewiesenen Werte übertroffen hätten [182].

Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.10 grafisch dargestellt. Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=3$.

3.4.2 PD 98059 hemmt die Leptin-induzierte Endothelzellmigration

Um nun zu untersuchen, ob die ERK1/2-MAP-Kinasen auch an der Signaltransduktion bei der Leptin-induzierten Migration der humanen umbilikalen Endothelzellen beteiligt sind, erfolgte analog zu den vorhergegangenen Versuchen mit VEGF eine Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059. Dazu wurden jeweils die Konzentrationen mit dem in den vorhergehenden Versuchen beobachteten maximalen Effekt eingesetzt.

Die Stimulation durch Leptin erfolgte in einer Dosierung von 50 ng/ml; PD 98059 wurde in einer Konzentration von 30 μ M eingesetzt. Bei den unstimulierten Endothelzellen der Kontrolle war nur eine geringe Migration von $31,69 \pm 6,39$ Zellen pro Gesichtsfeld zu beobachten. Stimulation mit 50 ng/ml Leptin für die Dauer der Migration bewirkte einen signifikanten Anstieg der pro Gesichtsfeld durch den Filter gewanderten Zellen auf $72,18 \pm 17,47$. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 2,28 ($p < 0,05$).



* = $p < 0,05$ vs Kontrolle
 ** = $p < 0,01$ vs Kontrolle

Abbildung 3.10: **Leptin stimuliert die Endothelzellmigration**

In dieser Abbildung ist die dosisabhängige Steigerung der Endothelzellmigration durch Leptin dargestellt. Eine signifikante Steigerung der Migration wird bei einer Konzentration von 20 ng/ml Leptin induziert. Bei der maximalen Steigerung werden nahezu die Werte der Positivkontrolle mit Stimulation durch 20% FCS erreicht, die links in der Grafik dargestellt ist. Damit ist Leptin einer starker Stimulus für die Endothelzellmigration.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Koinkubation von Leptin in der oben genannten Konzentration mit 30 μ M PD 98059 für die Dauer der Migration. Nach der Koinkubation migrierten nur noch $21,67 \pm 5,60$ Zellen pro Gesichtsfeld. PD 98059 bewirkte damit eine signifikante Hemmung der Leptin-vermittelten Endothelzellmigration ($p < 0,05$). Der promigratorische Effekt von Leptin wurde durch 30 μ M PD 98059 vollständig aufgehoben, und es wanderten sogar noch weniger Zellen als in der Kontrolle durch den Filter. Dies zeigt, daß die ERK1/2-MAPK auch bei der durch Leptin induzierten Endothelzellmigration eine entscheidende Rolle spielen.

PD 98059 hatte in der angewandten Konzentration von 30 μ M keinen zytotoxischen Effekt auf die HUVEC. Es war keine Ablösung der Zellen vom Filter der modifizierten Boyden-Kammer zu beobachten, und die Zellen ließen sich nicht mit Trypan-Blau anfärben.

Die aufgeführten Daten sind in der Abbildung [3.11](#) dargestellt. Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=8$.

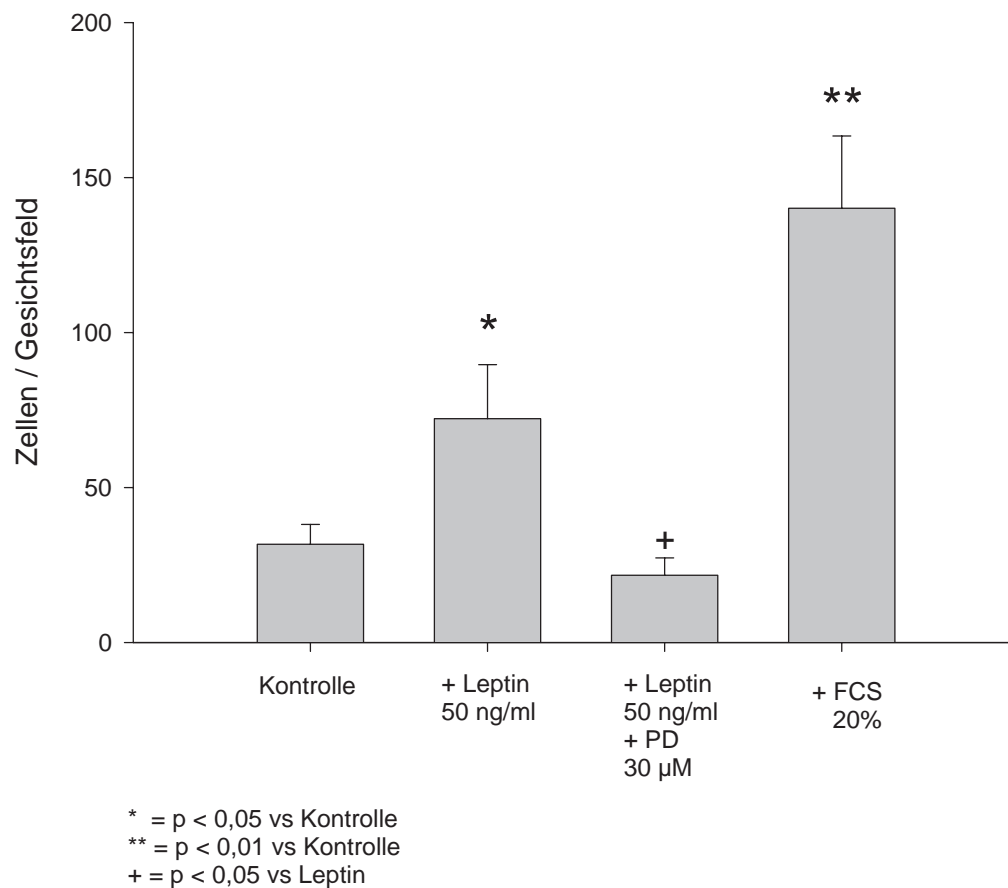


Abbildung 3.11: **PD 98059 hemmt die durch Leptin induzierte Endothelzellmigration**

Die Abbildung zeigt die vollständige Aufhebung des promigratorischen Effekts von Leptin durch den spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059. Dadurch wird gezeigt, daß die ERK1/2-MAP-Kinasen an der Signaltransduktion der durch Leptin vermittelten Endothelzellmigration beteiligt sind. Eine Blockade dieses Aktivierungsweges bewirkt die völlige Aufhebung der promigratorischen Wirkung von Leptin. In der rechten Säule des Diagramms ist als Positivkontrolle die durch 20% FCS induzierte Endothelzellmigration pro Gesichtsfeld dargestellt.

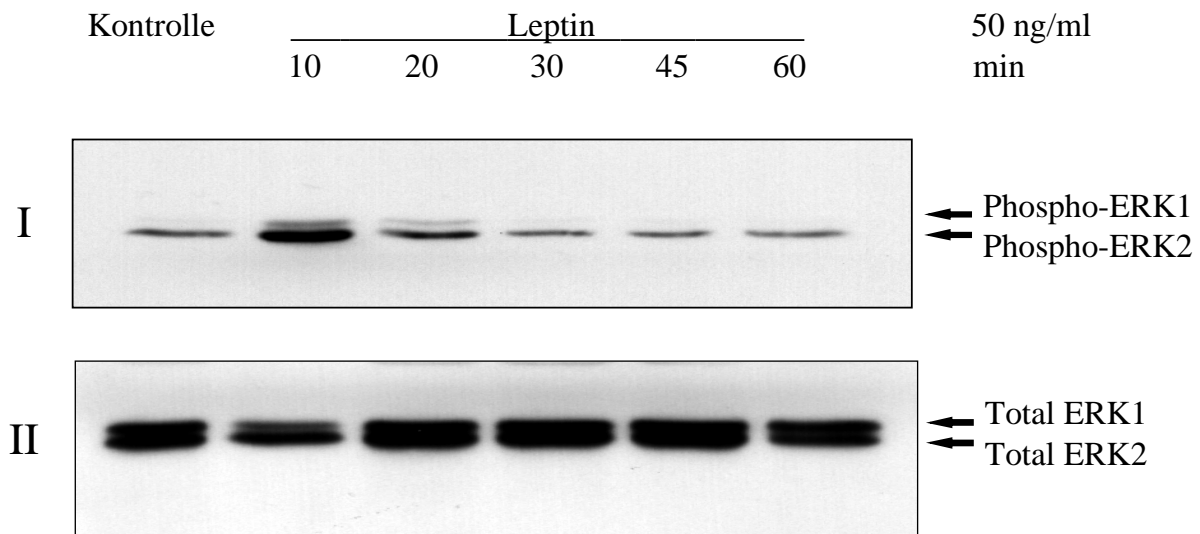


Abbildung 3.12: **Leptin aktiviert die ERK1/2-MAPK**

3.4.3 Leptin bewirkt eine transiente Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen

Die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen ist ein wichtiger Schritt bei der Migration von vaskulären und nicht-vaskulären Zellen [31, 33, 195].

Nachdem der promigratorische Effekt von Leptin durch den pharmakologischen MEK-Inhibitor PD 98059 in den vorausgegangenen Migrationsversuchen signifikant gehemmt wurde, liegt eine Beteiligung der ERK1/2-MAP Kinasen an der Signaltransduktion der Leptin-induzierten Endothelzellmigration nahe. Um dies näher zu untersuchen, wurden Western Blots nach Stimulation der humanen umbilikalen Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin durchgeführt. Die aktivierten und phosphorylierten MAP Kinasen wurden durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen.

Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.12 dargestellt. Die Abbildung zeigt die transiente Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch Leptin. Der maximale Effekt wird nach 10 minütiger Stimulation erreicht. Leptin bewirkte zu diesem Zeitpunkt eine 3,4 fache Aktivierung der MAP Kinasen gegenüber der Kontrolle. Die Aktivierung nach 20 Minuten entsprach noch dem Faktor 1,7. Nach 30 Minuten Stimulation erreichte das Aktivitätsniveau der phosphorylierten MAP Kinasen wieder die Werte der Kontrolle. In der unteren Grafik II wird die gesamte MAP Kinase dargestellt. Leptin hatte im untersuchten Zeitraum keinen Einfluß auf die Expression der ERK1/2-MAP Kinasen in Endothelzellen. Zusammenfassend wird hier ersichtlich, daß Leptin eine vorübergehende signifikante Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen bewirkt.

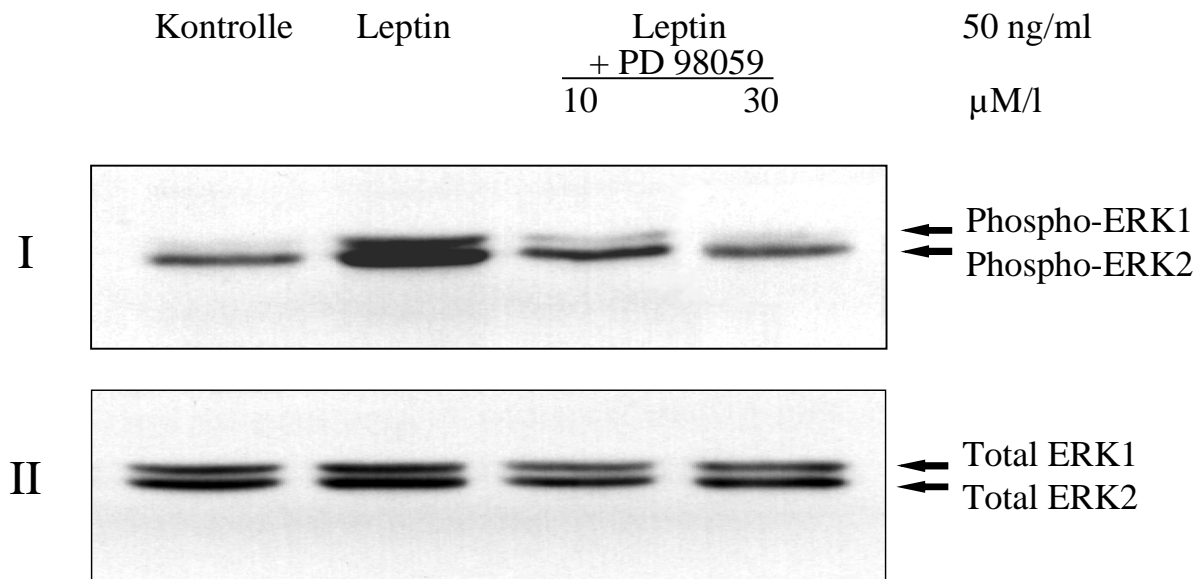


Abbildung 3.13: **PD 98059 hemmt die Aktivierung der ERK1/2-MAPK durch Leptin**

3.4.4 PD 98059 hemmt die Leptin-induzierte Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen in Endothelzellen

In einem nächsten Schritt wurde analog zu den vorhergegangenen Migrationsversuchen eine Koinkubation von 50 ng/ml Leptin mit dem pharmakologischen MEK-Inhibitor PD 98059 durchgeführt. Die aktivierten ERK1/2-MAP Kinasen wurden durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Western Blots sind in der Abbildung 3.13 dargestellt. Wieder wird die signifikante Aktivierung und Phosphorylierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch 50 ng/ml Leptin ersichtlich. Durch Leptin-Stimulation wurde die Aktivität der MAPK um den Faktor 3,54 gegenüber der Kontrolle gesteigert. Darüberhinaus zeigt sich eine dosisabhängige Hemmung der Leptin-induzierten Aktivierung der MAPK durch den spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059. 10 μM PD 98059 hemmten die Leptin-induzierte Phosphorylierung der ERK1/2 MAPK um 77,2%. Der maximale inhibitorische Effekt wurde bei einer Konzentration von 30 μM PD erreicht; das Aktivitätsniveau der MAPK lag bei den Werten der Kontrolle, die Leptin-induzierte Aktivierung der MAPK war damit vollständig aufgehoben. In der Grafik II zeigt sich, daß auch bei der Koinkubation von Leptin und PD 98059 die Gesamtmenge der ERK1/2-MAP Kinasen unverändert bleibt.

3.4.5 Thiazolidinedione hemmen die Leptin-induzierte Endothelzellmigration

Thiazolidinedione wie Ciglitazone und Troglitazone sind insulinsensitivierende Antidiabetika, die eine Inhibition der Migration glatter Gefäßmuskelzellen und Monozyten über die Aktivierung des nukleären Rezeptors Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) bewirken [131, 68, 105]. In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob Thiazolidinedione auch einen Einfluß auf die Leptin-induzierte Endothelzellmigration haben. Dazu wurde ein Migrationsversuch durchgeführt, bei dem eine Koinkubation von 50 ng/ml Leptin mit den PPAR γ -Liganden Ciglitazone und Troglitazone für die Dauer der Migration erfolgte.

Bei Stimulation mit 50 ng/ml Leptin für eine Dauer von fünf Stunden waren im Mittel $110,0 \pm 83,40$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer gewandert, im Vergleich zu $49,13 \pm 9,78$ Zellen in der Kontrolle ($p < 0,01$). Nach fünfstündiger Koinkubation von Leptin mit 10 μ M Ciglitazone migrierten noch $63,88 \pm 22,45$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer Hemmung der Leptin-induzierten Migration um 75,82 %. Die Behandlung mit 20 μ M Ciglitazone hatte einen noch deutlicheren inhibitorischen Effekt; die promigratorische Wirkung von Leptin wurde vollständig aufgehoben. Es waren im Mittel $41,25 \pm 7,72$ Zellen migriert ($p < 0,05$). Nach der Koinkubation von Leptin und 10 μ M Troglitazone migrierten noch $58,30 \pm 11,34$ Zellen je Gesichtsfeld. Damit bewirkte Troglitazone in einer Konzentration von 10 μ M eine signifikante Hemmung der Leptin-induzierten Migration humaner umbilikaler Endothelzellen um 84,97% ($p < 0,05$). In einer Konzentration von 20 μ M hatte Troglitazone schließlich die stärkste hier beobachtete inhibitorische Wirkung. Es migrierten nur noch $33,0 \pm 5,51$ Endothelzellen pro Gesichtsfeld ($p < 0,01$). Damit migrierten weniger Zellen als in der Kontrolle, und die Leptin-induzierte Endothelzellmigration wurde komplett aufgehoben. Zusammenfassend erwiesen sich die Thiazolidinedione Ciglitazone und Troglitazone als potente Inhibitoren der durch Leptin induzierten Endothelzellmigration. Es wurde kein zytotoxischer Effekt der Thiazolidinedione auf die HUVEC festgestellt, der sich etwa durch die Ablösung der an den Filter der modifizierten Boyden-Kammer adhärierenden Endothelzellen oder durch Anfärbbarkeit der Zellen mit Trypan-Blau manifestiert hätte.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=5$. Die Abbildung 3.14 zeigt die angeführten Ergebnisse.

3.4.6 Thiazolidinedione haben keinen Einfluß auf die Leptin-stimulierte Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen

Um zu untersuchen, ob diese migrationshemmende Wirkung der Thiazolidinedione auf einer Hemmung der Leptin-induzierten Phosphorylierung der ERK1/2-MAP Kinasen beruht, wurden in einem nächsten Schritt Western Blots nach Koinkubation der humanen umbilikalen Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin und Troglitazone bzw. Ciglitazone in den schon im Migrationsversuch verwendeten Konzentrationen durchgeführt. Die aktivierten und phosphorylierten ERK1/2-MAP Kinasen wurden durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen.

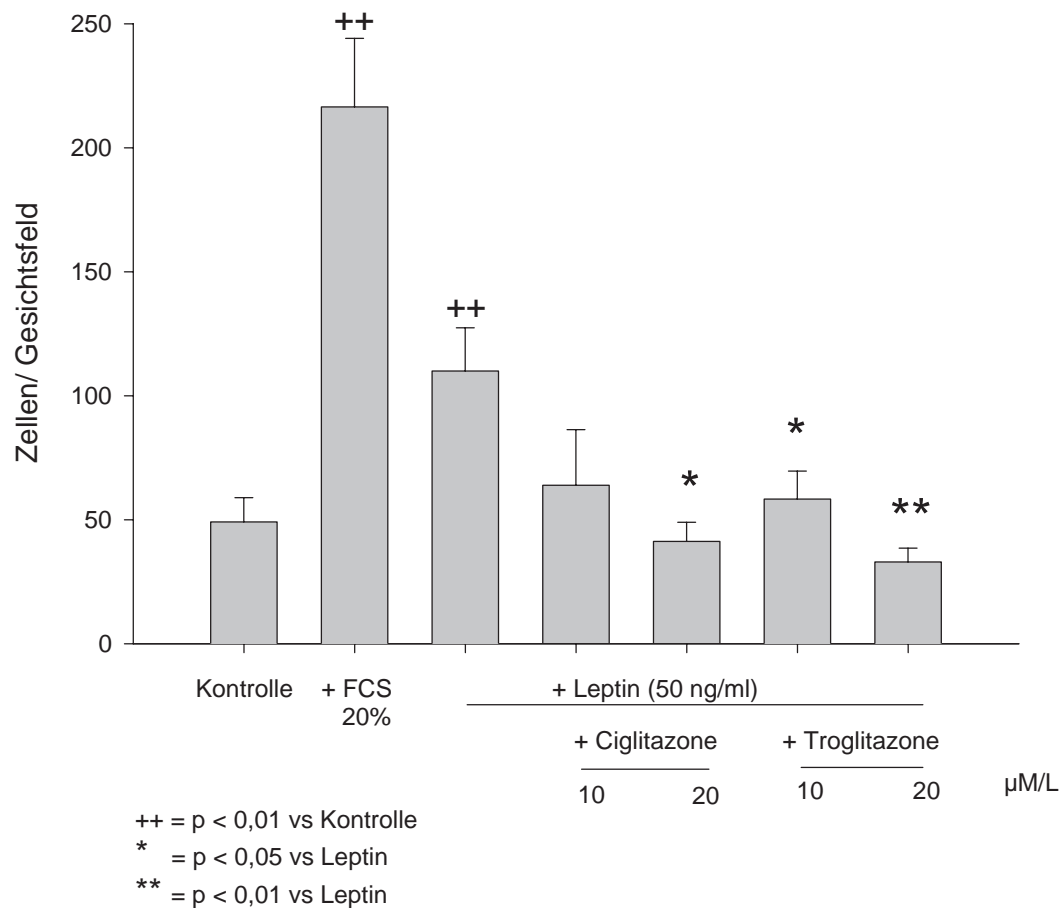


Abbildung 3.14: **Thiazolidinedione hemmen die durch Leptin induzierte Endothelzellmigration**

In der Abbildung ist die dosisabhängige Inhibition des promigratorischen Effekts von Leptin durch Thiazolidinedione dargestellt. Ciglitazone bewirkt in einer Konzentration von 20 μM eine signifikante Hemmung der Leptin-vermittelten Endothelzellmigration. Der inhibitorische Effekt von Troglitazone ist bei jeweils entsprechenden Konzentrationen noch stärker als der von Ciglitazone. Die stärkste beobachtete Hemmung der Leptin-induzierten Endothelzellmigration wurde durch 20 μM Troglitazone bewirkt.

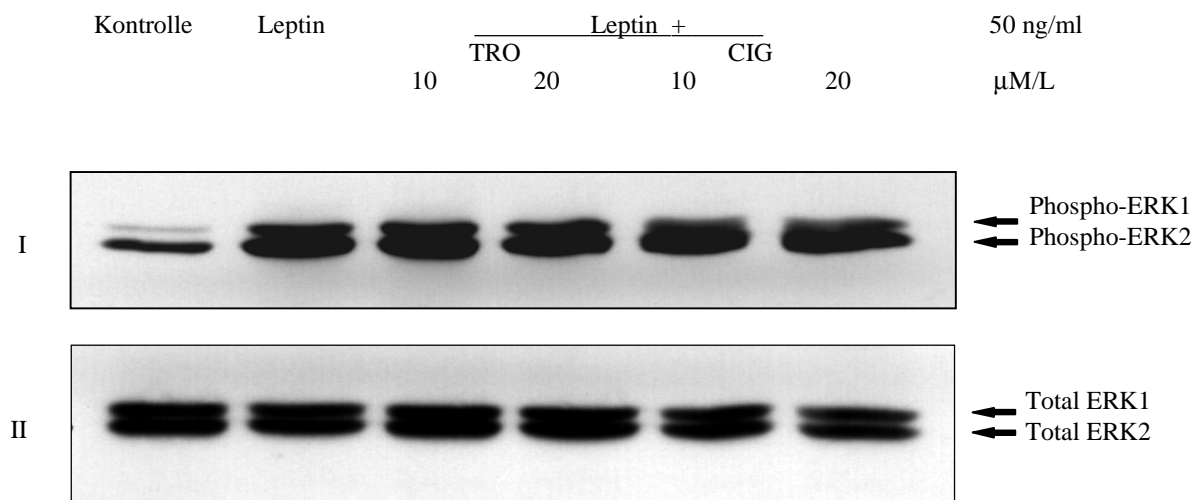


Abbildung 3.15: **Thiazolidinedione hemmen nicht die Aktivierung der ERK1/2-MAPK durch Leptin**

Die Abbildung zeigt die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen nach 10minütiger Stimulation der humanen umbilikalen Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin. Wie in Abbildung I gezeigt, inhibiert weder Troglitazone noch Ciglitazone in den getesteten Konzentrationen die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinasen durch Leptin. Die Abbildung II zeigt die gemessenen Werte für die gesamten ERK1/2-MAP Kinasen. Sie werden weder durch Stimulation mit Leptin noch durch die Koinkubation mit den migrationshemmenden Thiazolidinedionen beeinflusst.

Das Ergebnis dieser Western Blots zeigt die Abbildung 3.15. Weder Troglitazone noch Ciglitazone inhibiert die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen durch Leptin. Demnach muß die antimigratorische Wirkung von Troglitazone und Ciglitazone distal der ERK1/2-MAP Kinasen oder über einen anderen Weg der Signaltransduktion als den der ERK1/2-MAP Kinasen erfolgen.

3.4.7 Wortmannin hemmt die Leptin-induzierte Endothelzellmigration

Die Proteinkinase Akt ist ein Substrat der Phosphatidylinositolkinase 3 (PI3K) und spielt eine wichtige Rolle in der VEGF-vermittelten Endothelzellmigration [138]. Es konnte auch eine Beteiligung von Akt an der Signaltransduktion der Leptin-induzierten Migration nicht-vaskulärer Zellen nachgewiesen werden [6]. Über die Rolle von Akt bei der Leptin-induzierten Endothelzellmigration liegen dagegen noch keine Erkenntnisse vor.

Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz untersucht, ob die Proteinkinase Akt an der Signalkaskade der Leptin-vermittelten Migration humaner umbilikaler Endothelzellen beteiligt ist. Dazu erfolgte ein Migrationsversuch mit einer Koinkubation von 50 ng/ml Leptin und dem PI3K/Akt-Inhibitor Wortmannin für die Dauer der Migration.

Durch Stimulation mit Leptin erfolgte eine signifikante Steigerung der Endothelzellmigration gegenüber der Kontrolle: gegenüber $62,92 \pm 11,36$ Zellen pro Gesichtsfeld in der Kontrolle migrierten nach Leptin-Stimulation im Mittel $107,93 \pm 9,39$ Zellen je Gesichtsfeld. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung um den Faktor 1,72 ($p < 0,01$).

Nach Koinkubation mit 50 nM Wortmannin migrierten noch $64,92 \pm 4,52$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer Hemmung der Leptin-induzierten Migration um 95,56% ($p < 0,01$). Die Koinkubation mit 100 nM Wortmannin hob den promigratorischen Effekt von Leptin vollständig auf. Hier wanderten nur noch $44,83 \pm 7,12$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer ($p < 0,01$).

Die Koinkubation mit dem PI3K/Akt-Inhibitor Wortmannin bewirkte damit eine signifikante Hemmung der promigratorischen Wirkung von Leptin. Eine zytotoxische Wirkung von Wortmannin auf die HUVEC wurde in den eingesetzten Konzentrationen nicht beobachtet.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche betrug $n=5$. Die Abbildung 3.16 zeigt die aufgeführten Daten.

3.4.8 Leptin aktiviert die Proteinkinase Akt in Endothelzellen

Um die Kinetik der PI3K/Akt-Aktivierung bei der Signaltransduktion der Leptin-induzierten Migration von Endothelzellen zu untersuchen, wurde eine Stimulation mit 50 ng/ml Leptin über verschiedene Zeiten durchgeführt. Anschließend wurde die Aktivität der Proteinkinase Akt mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper gegen die aktivierte Akt gemessen und im Western Blot dargestellt.

Das Ergebnis dieser Western Blots ist in der Abbildung 3.17 dargestellt. Die Abbildung zeigt die transiente Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Leptin. Das Maximum der Akt-Aktivität wurde nach einer Stimulationsdauer von 30 min. gemessen. Zu diesem

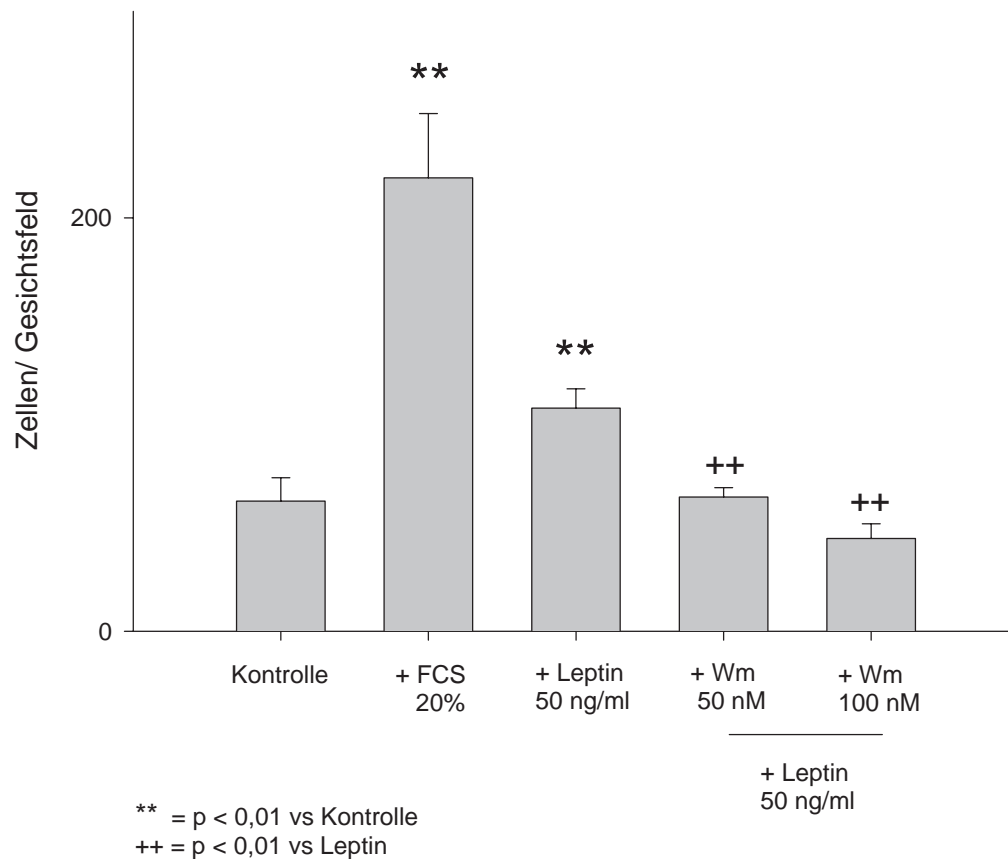


Abbildung 3.16: **Wortmannin hemmt die durch Leptin induzierte Endothelzellmigration**

In dieser Abbildung ist die dosisabhängige und signifikante Hemmung der Leptin-vermittelten Endothelzellmigration durch den PI3K/Akt-Inhibitor Wortmannin dargestellt. Leptin steigert die Migration humaner umbilikaler Endothelzellen um den Faktor 1,72 gegenüber der Kontrolle. Dieser promigratorische Effekt wird durch Koinkubation mit 50 nM Wortmannin nahezu und durch 100 nM Wortmannin vollständig aufgehoben.

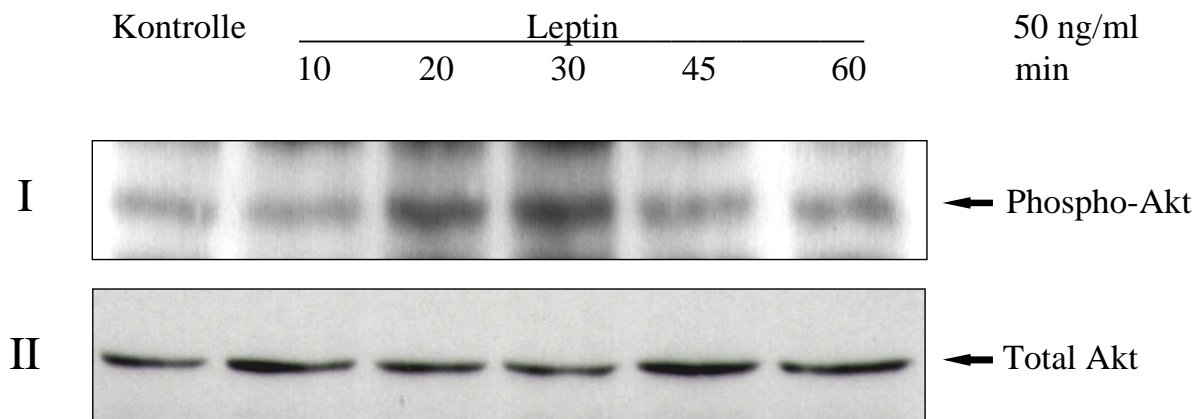


Abbildung 3.17: **Aktivierung der Akt durch Leptin**

Zeitpunkt war die Aktivität von Akt gegenüber der Kontrolle um den Faktor 3,2 gesteigert. Nach 60 min. wurden wieder die Werte der Kontrolle erreicht. In der unteren Grafik II ist die Gesamt-Akt dargestellt. Wie schon bei den ERK1/2-MAP Kinasen hat die Stimulation mit 50 ng/ml Leptin auch auf die Expression der Proteinkinase Akt im untersuchten Zeitraum keinen Einfluß.

3.4.9 Wortmannin hemmt die Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Leptin

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Hemmung der promigratorischen Wirkung von Leptin auf humane umbilikale Endothelzellen durch den Inhibitor des PI3K/Akt-Pathways Wortmannin auf eine Hemmung der Leptin-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase Akt zurückzuführen ist. Dazu erfolgte eine Koinkubation der Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin und Wortmannin in den beiden im Migrationsversuch angewendeten Konzentrationen, 50 nM und 100 nM, über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Die Aktivität der Proteinkinase Akt wurde mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die aktivierte Akt gemessen und im Western Blot dargestellt.

Es zeigte sich, daß Wortmannin die Aktivierung und Phosphorylierung von Akt durch Leptin dosisabhängig und signifikant hemmt.

Die Abbildung 3.18 stellt das Ergebnis dieser Western Blots dar.

3.4.10 Thiazolidinedione hemmen die Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Leptin

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Thiazolidinedione und Liganden für den nukleären Rezeptor PPAR γ Troglitazone und Ciglitazone die Leptin-

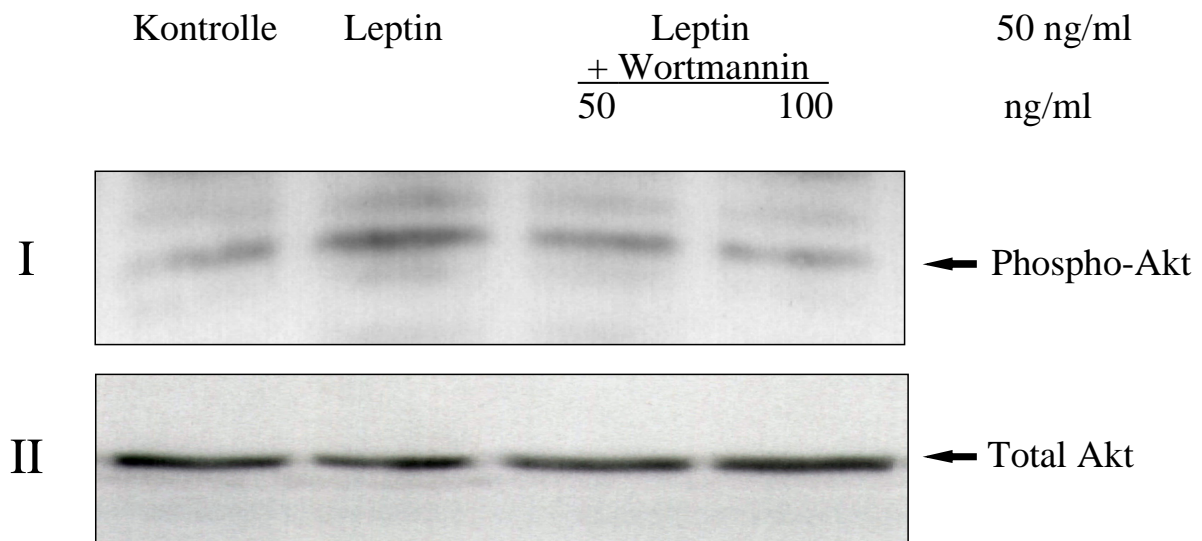


Abbildung 3.18: **Wortmannin hemmt die Aktivierung der Akt durch Leptin**

In der Abbildung ist die dosisabhängige Hemmung der Leptin-induzierten Aktivierung und Phosphorylierung der Proteinkinase Akt durch Wortmannin dargestellt. Stimulation der Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin bewirkte eine transiente Aktivierung von Akt um den Faktor 3,37 gegenüber der Kontrolle, wie in der zweiten Bande der Grafik I ersichtlich. Die Koinkubation mit 50 nM Wortmannin bewirkte eine deutliche Hemmung dieses Effekts von Leptin um 71,1% . Die Koinkubation mit 100 nM Wortmannin hob die Leptin-induzierte Aktivierung und Phosphorylierung der Akt dagegen vollständig auf. In der Grafik II sind die gemessenen Werte für die Gesamt-Akt dargestellt. Weder die Stimulation mit Leptin noch die Behandlung mit Wortmannin hatte einen Einfluß auf die Expression der Proteinkinase Akt in humanen umbilikalen Endothelzellen.

induzierte Endothelzellmigration signifikant hemmen (siehe 3.4.5). Die Western Blots hatten allerdings ergeben, daß diese Inhibition der promigratorischen Wirkung von Leptin nicht auf eine Hemmung der ERK1/2-MAP Kinasen zurückzuführen ist, da diese durch Behandlung mit den Thiazolidinedionen nicht beeinflußt wurden (siehe 3.4.6). Nachdem nun weiterhin gezeigt wurde, daß auch die Proteinkinase Akt an der Signaltransduktion bei der Leptin-vermittelten Endothelzellmigration beteiligt ist, wurde im Folgenden der Einfluß der Thiazolidinedione auf die Akt untersucht.

Dazu erfolgte eine Koinkubation mit 50 ng/ml Leptin und mit Troglitazone bzw. Ciglitazone in den beiden auch im Migrationsversuch verwendeten Konzentrationen. Die Aktivierung und Phosphorylierung der Proteinkinase Akt wurde durch phosphospezifische Antikörper gegen die aktivierte Akt nachgewiesen. Sowohl Troglitazone in den Konzentrationen 10 µM und 20 µM als auch 10 µM Ciglitazone hoben die Aktivierung der Akt durch Leptin nahezu vollständig auf; 20 µM Ciglitazone bewirkte eine vollständige Hemmung der Akt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die antimigratorische Wirkung der Thiazolidinedione auf humane umbilikale Endothelzellen durch den PI3K/Akt-Pathway vermittelt wird.

Das Ergebnis dieser Western Blots zeigt die Abbildung [3.19](#).

3.4.11 PD 98059 hat keinen Einfluß auf die Aktivierung von Akt durch Leptin

Die Proteinkinase Akt beeinflußt die Zellmotilität über die Bestandteile des Zytoskeletts Aktin und Myosin [[134](#), [138](#)]. Die vorhergehenden Versuche hatten gezeigt, daß die Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone die promigratorische Wirkung von Leptin auf humane umbilikale Endothelzellen über den PI3K/Akt-Pathway signifikant hemmen, daß sie aber keinen Einfluß auf die Aktivität der ERK1/2-MAP Kinasen haben. Dies läßt zwei Schlußfolgerungen zu, nämlich daß die Aktivierung der PI3K bzw. die Aktivierung von Akt downstream der ERK1/2-MAP Kinasen erfolgt, oder aber daß es sich hier um zwei unabhängige Pathways der Signaltransduktion handelt, die beide eine wichtige Rolle für die Endothelzellmigration spielen.

Um nun das Zusammenspiel dieser beiden für die Endothelzellmigration essentiellen Proteinkinasen näher zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Koinkubation mit 50 ng/ml Leptin und mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 durchgeführt. Im Western Blot wurde die Aktivierung und Phosphorylierung der Proteinkinase Akt durch phosphospezifische Antikörper gegen die aktivierte Akt nachgewiesen. Dort zeigte sich, daß der MEK-Inhibitor PD 98059 keinen Einfluß auf die Aktivierung und Phosphorylierung der Akt hat.

Bei einer Lokalisation der Akt downstream der ERK1/2-MAP Kinasen hätte PD 98059 die Aktivierung und Phosphorylierung der Akt hemmen müssen. Dies bedeutet, daß die ERK1/2-MAP Kinasen der Proteinkinase Akt nicht in einer Signalkaskade vorgeschaltet sind. Damit ist zu folgern, daß es sich bei den Proteinkinasen Akt und ERK1/2-MAP Kinasen um zwei verschiedene Wege der Signaltransduktion handelt, für die in den vor-

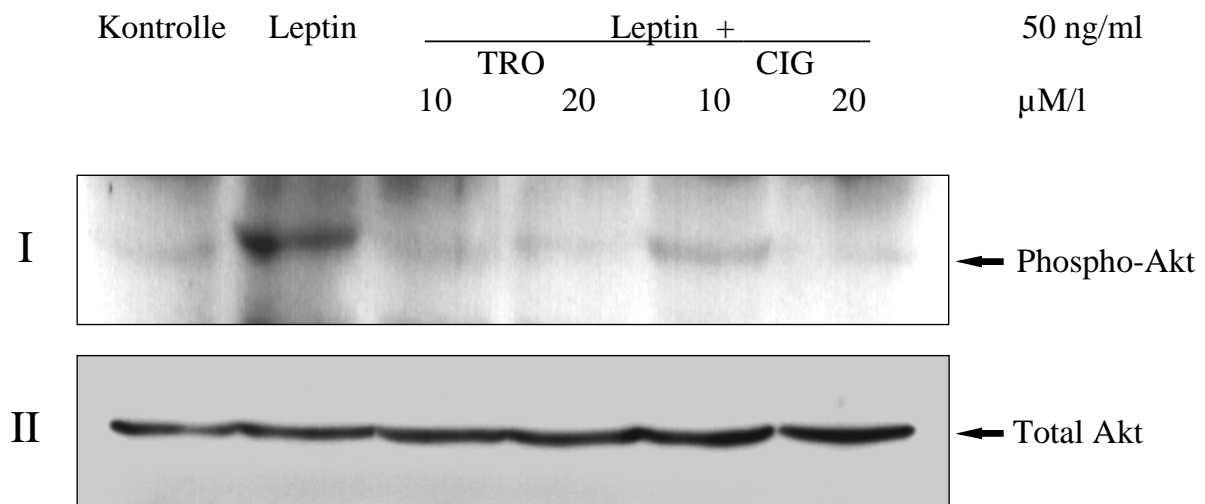


Abbildung 3.19: **Thiazolidinedione hemmen die Aktivierung der Akt durch Leptin**

Die Abbildung zeigt die Hemmung der Proteinkinase Akt durch die Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone. Stimulierung der Endothelzellen mit 50 ng/ml Leptin bewirkt eine signifikante Aktivierung von Akt um den Faktor 3,4 gegenüber der Kontrolle. Die Koinkubation mit Troglitazone in den Konzentrationen 10 μM und 20 μM hemmt diese Leptin-induzierte Phosphorylierung der Akt nahezu vollständig, nämlich um 95,4% bzw. 97%. Bei Koinkubation mit 10 μM Ciglitazone beträgt die Hemmung der Leptin-induzierten Aktivierung der Akt 82,6%, bei Vorbehandlung der HUVEC mit 20 μM Ciglitazone wird sie vollständig aufgehoben. Die Grafik II zeigt, daß die Expression der Proteinkinase Akt im untersuchten Zeitraum weder durch Leptin noch durch die PPAR γ -Liganden Troglitazone und Ciglitazone beeinflußt wird.

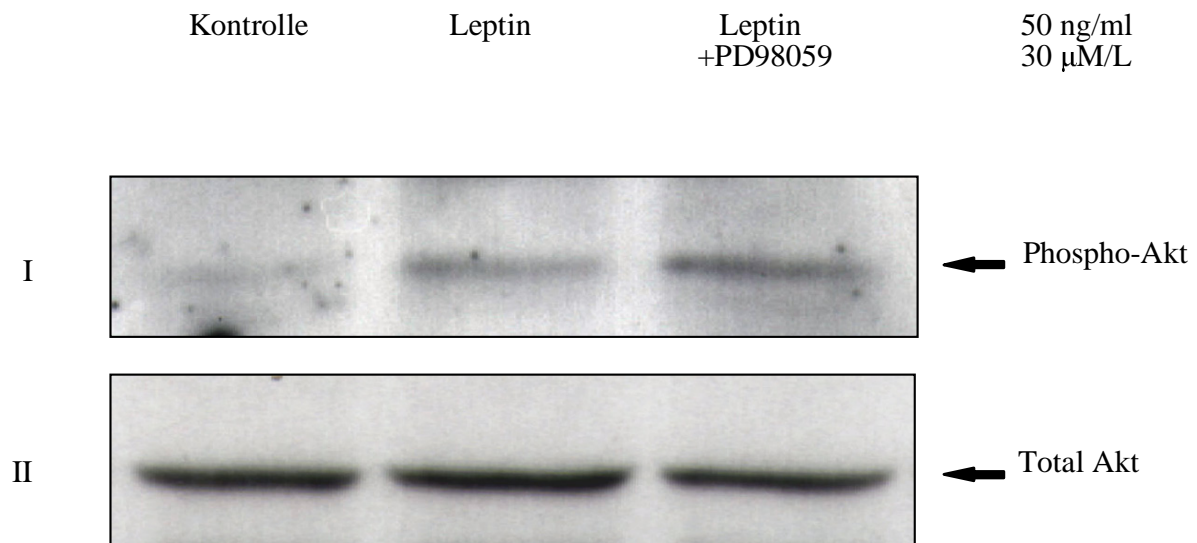


Abbildung 3.20: **PD 98059 hemmt nicht die Aktivierung der Akt durch Leptin**

In der Abbildung ist die Aktivierung und Phosphorylierung der Proteinkinase Akt durch Leptin dargestellt. Es ist eine deutliche Aktivitätssteigerung der Akt gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Die Koinkubation mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 in einer Konzentration von 30 μ M bewirkt keine Aktivitätsminderung der Akt.

angegangenen Versuchen eine essentielle Rolle bei der Leptin-induzierten Endothelzellmigration gezeigt werden konnte. Die Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis dieser Western Blots.

3.5 Inhibitoren der Endothelzellmigration

3.5.1 $\text{TNF}\alpha$ hat keine promigratorische Wirkung auf Endothelzellen

$\text{TNF}\alpha$ ist ein pleiotropes Zytokin, für das eine Schlüsselrolle in verschiedenen Entzündungsprozessen nachgewiesen werden konnte [163]. So besitzt $\text{TNF}\alpha$ beispielsweise eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile [58] und auf Fibroblasten [156]. Darüberhinaus stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen über eine Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen [69].

Um die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf die Migration von Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein Migrationsversuch mit der modifizierten Boyden-Kammer und mit einer Stimulation durch $\text{TNF}\alpha$ durchgeführt. Bei den unbehandelten Zellen der Kontrolle waren im Mittel $40,63 \pm 10,18$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer migriert. Die Positivkontrolle mit Stimulation durch 20% FCS ergab eine signifikante Steigerung der Anzahl migrierter Zellen. Dort waren im Schnitt $309,13 \pm 85,09$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert. Die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ in einer Konzentration von 500 U/ml über die Dauer der Migration ergab keine signifikante Steigerung der Endothelzellmigration; im Mittel wanderten pro Gesichtsfeld $57,38 \pm 10,14$ Zellen durch den Filter. Allerdings bewirkte die Koinkubation der humanen umbilikalen Endothelzellen mit 500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und mit 30 μM PD 98059, einem spezifischen Inhibitor der ERK1/2-MAP Kinasen, eine signifikante Hemmung der Migration auf im Schnitt $29,88 \pm 10,04$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer Hemmung der Endothelzellmigration unter die Werte der Kontrolle ($p < 0,05$).

Die Anzahl der durchgeführten Versuche beträgt $n=4$. Die oben ausgeführten Ergebnisse sind in der Abbildung 3.21 dargestellt.

3.5.2 24h-Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration

Nachdem die kurzfristige Inkubation der Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ die Endothelzellmigration nicht stimuliert hatte, wurden in einem nächsten Schritt Langzeiteffekte von $\text{TNF}\alpha$ auf das Migrationsverhalten von humanen umbilikalen Endothelzellen untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen für 24 Stunden mit 500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ inkubiert. Für diese Zeit der Inkubation blieben die sonstigen Kulturbedingungen unverändert, und die erforderlichen Mengen an $\text{TNF}\alpha$ wurden lediglich zum normalen Medium hinzugefügt. Im Anschluß wurden die Zellen gewaschen und schließlich in Migrationsversuchen verwendet. Es erfolgte dann die kurzfristige Stimulation der HUVEC mit $\text{TNF}\alpha$, mit VEGF und mit $\text{TNF}\alpha$ und VEGF zusammen. Bei den unbehandelten Zellen waren in der Kontrolle im Mittel $20,33 \pm 4,99$ Zellen pro Gesichtsfeld migriert, bei den über 24h mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten waren es $25,5 \pm 11,35$. Stimulation mit 20% FCS bewirkte sowohl bei den unbehandelten als auch bei den über 24h mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten HUVEC einen signifikanten Anstieg der pro Gesichtsfeld migrierten Zellen auf $136,83 \pm 21,56$ ($p < 0,01$).

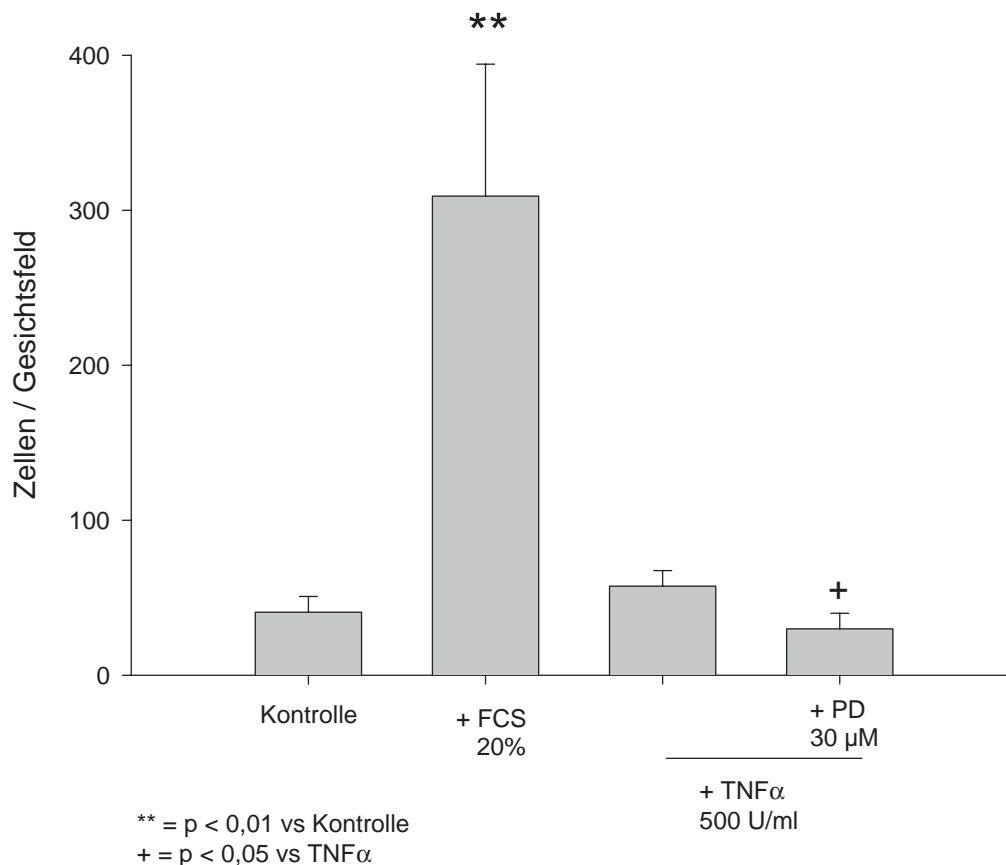


Abbildung 3.21: **TNF α stimuliert nicht die Endothelzellmigration**

Die Abbildung veranschaulicht das Ergebnis der Migrationsversuche mit TNF α -Stimulation. Durch die Behandlung der Endothelzellen mit 500 U/ml TNF α wird keine signifikante Steigerung der Migration bewirkt. Im Gegensatz dazu steht die signifikante Steigerung der Endothelzellmigration durch 20% FCS, die hier in der zweiten Säule als Positivkontrolle dargestellt ist. Der spezifische MEK-Inhibitor PD 98059 bewirkt eine signifikante Hemmung der Endothelzellmigration. Dies spricht für eine Beteiligung der ERK1/2-MAP Kinasen an der Transduktion des promigratorischen Impulses.

bzw. auf $164,80 \pm 35,51$ ($p < 0,01$). Die Stimulation mit 500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ über die Dauer der Migration bewirkte - wie auch schon im vorhergehenden Versuch - keinen signifikanten Anstieg der Endothelzellmigration, und zwar unabhängig von einer vorangehenden $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation über 24h. Bei den unbehandelten Zellen migrierten im Schnitt $22,83 \pm 3,55$, bei den über 24 h mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten HUVEC migrierten im Mittel $19,00 \pm 5,11$ Zellen pro Gesichtsfeld.

Die Koinkubation mit 10 ng/ml VEGF hatte dagegen unterschiedliche Effekte. Bei den unbehandelten HUVEC ergab sich eine signifikante Steigerung der Migration auf im Mittel $293,50 \pm 69,35$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 14,44 gegenüber der Kontrolle ($p < 0,01$). Die über 24 h mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten HUVEC zeigten jedoch nur eine sehr schwache migratorische Reaktion auf die Stimulation mit 10 ng/ml VEGF. Hier wanderten nur $64,17 \pm 19,89$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter. Damit wurde die Migration gegenüber der entsprechenden Kontrolle lediglich um den Faktor 2,52 und damit signifikant geringer als bei den unbehandelten HUVEC gesteigert.

Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der kurzzeitigen Stimulation der HUVEC sowohl mit 500 U/ml $\text{TNF}\alpha$ als auch mit 10 ng/ml VEGF. Die nicht mit $\text{TNF}\alpha$ vorbehandelten Zellen wurden zu einer starken Migration angeregt. Dort wanderten im Schnitt $234,83 \pm 73,43$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer. Dies entspricht einer signifikanten Zunahme der Migration um den Faktor 11,55 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Bei den mit $\text{TNF}\alpha$ vorbehandelten HUVEC hatte die Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ und VEGF hingegen kaum eine promigratorische Wirkung. Es migrierten im Schnitt $30,50 \pm 15,24$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer Steigerung der Migration um den Faktor 1,2 gegenüber der Kontrolle. Auch hier war die Zunahme der Zahl migrierter HUVEC signifikant geringer als beim gleichen Versuchsansatz mit unbehandelten HUVEC.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche lag bei $n=3$. Die Abbildung 3.22 stellt diese Ergebnisse grafisch dar.

3.5.3 24h-Stimulation mit CD40L hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration

CD40, ein Glykoprotein der Größe von 50 kDa, ist ein Rezeptor aus der Familie der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren. Die Expression von CD40 auf humanen T-Zellen ist bekannt. Auch auf humanen Endothelzellen in Entzündungsgebieten und in der Kultur konnte die Expression von CD40 nachgewiesen werden [89]. Dort dient es als Rezeptor für CD40L, das über eine Bindung an diesen Rezeptor die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen steigert. Außerdem werden Metalloproteinasen vermehrt sezerniert [122]. Der entsprechende Ligand, CD40L (CD154), wird hauptsächlich von aktivierten CD4-positiven Lymphozyten exprimiert.

In den folgenden Migrationsversuchen sollte untersucht werden, welchen Einfluß CD40L auf das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen hat. Dazu erfolgte analog zu den

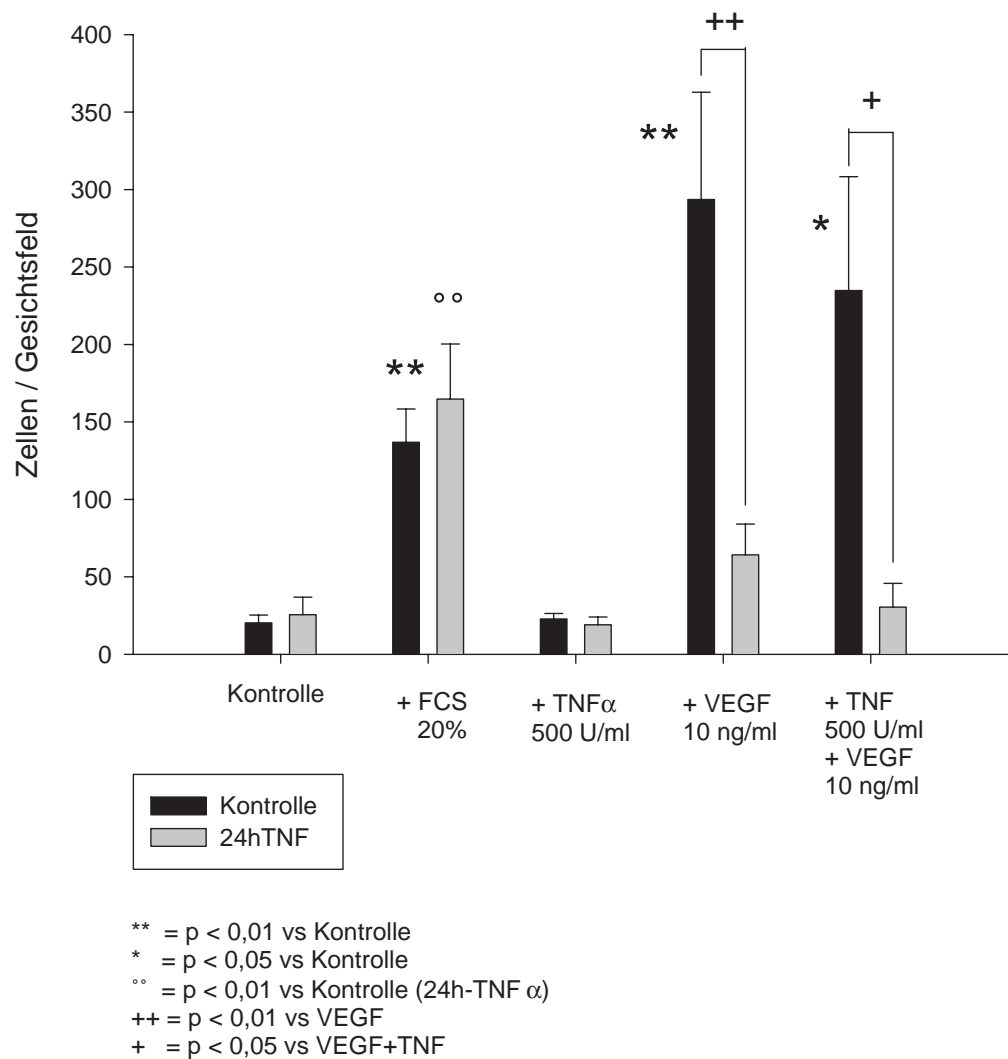


Abbildung 3.22: **TNF α hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration**

Die Abbildung zeigt den hemmenden Effekt einer 24h-Stimulation mit TNF α auf die VEGF-vermittelte Endothelzellmigration. Es sind jeweils die pro Gesichtsfeld migrierten Zellzahlen gegenübergestellt. Die schwarz gefärbten Säulen zeigen das Migrationsverhalten unbehandelter HUVEC, die grau gefärbten das von 24h mit TNF α inkubierten HUVEC an. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Vorbehandlung mit TNF α die promigratorische Wirkung von VEGF nahezu aufhebt ($p < 0,01$).

Versuchen mit $\text{TNF}\alpha$ eine Inkubation der HUVEC mit CD40L-positiven Zellen, die entsprechend dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren fixiert worden waren und in einer gleichbleibenden Konzentration dem ansonsten unveränderten Kulturmedium für die Endothelzellen beigegeben wurden. Die Stimulation wurde über einen Zeitraum von 24h durchgeführt.

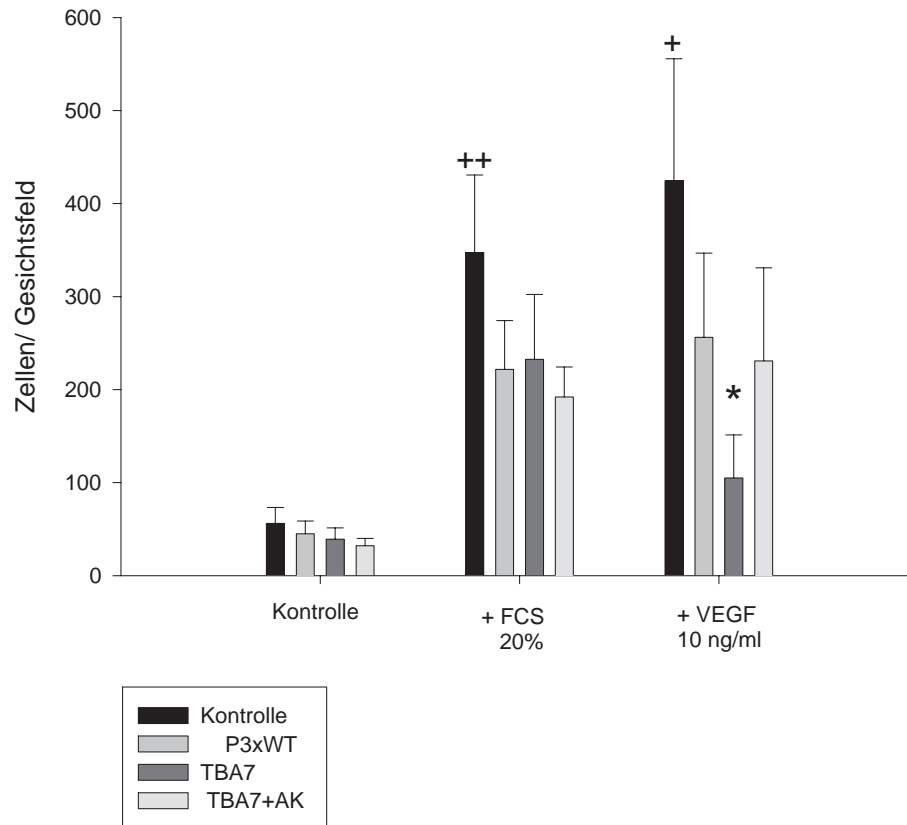
Als Kontrolle wurden einerseits völlig unbehandelte HUVEC eingesetzt. Außerdem wurden nicht transfizierte Wildtyp(WT)-Myeloma-Zellen zur Stimulation der HUVEC über 24h verwendet, die den CD40L nicht exprimierten, und schließlich noch transfizierte, also CD40L-positive Zellen, bei denen aber der CD40L durch vorherige Bindung von TRAP-1, einem spezifischen Antikörper, blockiert war.

Das Migrationsverhalten dieser vier unterschiedlich vorbehandelten Gruppen von humanen umbilikalen Endothelzellen wurde verglichen.

Im ersten untersuchten Ansatz, der Kontrolle, also ohne weitere Stimulation der HUVEC während der Dauer der Migration, unterschied sich das Verhalten der vier Gruppen von HUVEC nicht signifikant.

Nach der Stimulation mit 20% FCS migrierten bei den unbehandelten Zellen im Mittel $347,33 \pm 83,39$ Zellen pro Gesichtsfeld. Gegenüber $56,17 \pm 17,20$ migrierten Zellen in der Kontrolle entspricht dies einem signifikanten Zuwachs um den Faktor 6,18 ($p < 0,01$). Auch bei den mit CD40L und mit WT-Myeloma-Zellen über 24 h inkubierten HUVEC ergab sich durch Stimulation mit 20% FCS eine Steigerung der Migration um den Faktor 5,94 bzw. 4,93. Die Steigerung erfolgte damit allerdings auf deutlich geringerem Niveau als bei unbehandelten HUVEC. Die Migration der mit CD40L + TRAP-1 vorbehandelten HUVEC wurde durch Stimulation mit 20% FCS um den Faktor 5,97 gesteigert.

Die deutlichsten Unterschiede ergaben sich jedoch bei der Stimulation mit 10 ng/ml VEGF für die Dauer der Migration. Bei den unbehandelten HUVEC migrierten im Schnitt $424,5 \pm 131,11$ Zellen pro Gesichtsfeld. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung um den Faktor 7,56 gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$). Der promigratorische Effekt von VEGF kam hingegen bei den über 24 h mit CD40L stimulierten HUVEC kaum zum Tragen. Dort wanderten im Mittel nur $105,0 \pm 46,36$ Zellen pro Gesichtsfeld durch den Filter der modifizierten Boyden-Kammer. Damit wurde die Migration hier lediglich um den Faktor 2,68 und damit nicht signifikant gesteigert. Die mit WT-Zellen inkubierten HUVEC zeigten ein sehr ähnliches Verhalten wie die mit CD40L + TRAP-1-Antikörpern vorbehandelten Endothelzellen. Hier migrierten im Mittel $256,17 \pm 90,60$ bzw. $230,83 \pm 100,11$ Zellen pro Gesichtsfeld. Es ergab sich eine signifikant stärkere VEGF-induzierte Endothelzellmigration im Vergleich zu den mit CD40L vorbehandelten HUVEC. Die Anzahl der durchgeführten Versuche beträgt $n=3$. Die angeführten Ergebnisse zeigt die Abbildung 3.23.



* = $p < 0,05$ vs VEGF (P3xWT); vs VEGF (Kontrolle)
 ++ = $p < 0,01$ vs Kontrolle
 + = $p < 0,05$ vs Kontrolle

Abbildung 3.23: **CD40L hemmt die VEGF-induzierte Endothelzellmigration**

In der Abbildung ist der inhibitorische Effekt von CD40L auf die VEGF-vermittelte Endothelzellmigration dargestellt. Wie in der Legende erläutert, entsprechen die vier unterschiedlich gefärbten Säulen von links nach rechts jeweils unbehandelten HUVEC, mit WT-Myeloma-Zellen inkubierten HUVEC, mit CD40L inkubierten HUVEC, und schließlich mit CD40L + TRAP-1-Antikörpern vorbehandelten HUVEC. Die Inkubation der HUVEC mit CD40L über 24 h bewirkt eine signifikante Hemmung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration gegenüber der Migration a) unbehandelter HUVEC (linke Säule) und b) mit WT-Myeloma-Zellen über 24 h inkubierter HUVEC (zweite Säule von links) (jeweils $p < 0,05$). Diese hemmende Wirkung von CD40L auf die durch VEGF hervorgerufene Migration humaner Endothelzellen ist analog zu den bei 24h-Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ beobachteten Effekten.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren die Etablierung eines Migrationsassays für humane umbilikale Endothelzellen (HUVEC), die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Zytokine auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen und die nähere Charakterisierung wichtiger Schritte der Signaltransduktion der Endothelzellmigration.

Für die Wachstumsfaktoren a-FGF, FCS und VEGF konnte eine promigratorische Wirkung nachgewiesen werden. Auch Leptin erwies sich als ein potenter Stimulus für die Endothelzellmigration. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Aktivierung der ERK1/2-MAP Kinasen und der Proteinkinase Akt entscheidende Schritte in der Signaltransduktion der Leptin-vermittelten Endothelzellmigration darstellen. Darüber hinaus wurde eine inhibitorische Wirkung der insulinsensitivierenden Antidiabetika aus der Gruppe der Thiazolidinedione auf die Leptin-induzierte Migration von Endothelzellen nachgewiesen. Diese beruht auf einer Hemmung der Proteinkinase Akt durch die Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone.

Es wurden aber auch physiologische Inhibitoren der Endothelzellmigration gefunden. Die Vorbehandlung der HUVEC mit $\text{TNF}\alpha$ oder dem Liganden für CD40 bewirkte eine signifikante Reduzierung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration.

4.2 Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus

Die Fähigkeit zur Migration stellt eine Schlüsselfunktion von Endothelzellen dar. So erfordert die Angiogenese, die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden der Vaskulatur, neben der Proliferation von Endothelzellen auch deren Auswanderung aus dem normalen Zellverband [28]. Auch zur Reparatur von Gefäßwandverletzungen, wie sie beispielsweise nach Ballonangioplastie auftreten können, ist die Migration der Endothelzellen an den Ort der Läsion erforderlich.

Die im erwachsenen Organismus normalerweise ruhenden und einem nur geringen Turnover unterworfenen Endothelzellen werden durch verschiedene Reize zur Migration angeregt, die zum Beispiel in der Verletzung der geschlossenen Zellschicht oder in der lokalen oder systemischen Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren wie a-FGF, PDGF oder VEGF bestehen [164].

Bei der Endothelzellmigration lassen sich prinzipiell vier einzelne Vorgänge unterscheiden. Zunächst ist die Adhäsion der Endothelzellen an der extrazellulären Matrix der Basalmembran und an den benachbarten Zellen im geschlossenen Zellverband bzw. die Lösung dieser festen Bindung, die Deadhäsion, von Bedeutung.

Ein weiterer essentieller Faktor für die Migration ist die Invasivität der Endothelzellen. Diese bezeichnet die Fähigkeit der Zellen, Bestandteile der Basalmembran wie Typ IV Kollagen, Laminin, Entactin, Proteoglykane und Glycosaminoglycane [219] durch Proteolyse aufzulösen, um aus dem festen Zellverband auswandern zu können. Dazu werden Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die Plasmin-Aktivatoren Urokinase-like Plasminogen Activator (u-PA) und Tissue Plasminogen Activator (t-PA) und Plasminogen von den Endothelzellen sezerniert [188].

Die dritte Voraussetzung zur Endothelzellmigration besteht in der Motilität der Zellen, die über eine Umstrukturierung des Zytoskeletts aus Aktin und Myosin und eine Aktivierung der kontraktilen Mikrofilamente durch die Polymerisation von Aktin erreicht wird [75, 127].

Schließlich ist auch die Chemotaxis von entscheidender Bedeutung. Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Migration von Zellen in Richtung steigender Konzentrationen eines Reizes und steht im Gegensatz zur Chemokinese, der ungerichteten Zellbewegung. Eine ganze Reihe solcher Chemokine für Endothelzellen ist bereits beschrieben worden: So konnte eine gerichtete Endothelzellmigration durch a-FGF und b-FGF [164], durch Platelet-Derived Endothelial Growth Factor (PD-ECGF) [164], durch VEGF [30], durch Thymosin β 4 [127] und durch den Liganden für das Integrin α v β 3, Bone Sialoprotein [14], hervorgerufen werden.

In der Literatur werden zwei verschiedene Methoden zur Untersuchung der Endothelzellmigration beschrieben. Eine Möglichkeit stellt die intravitale Beobachtung im Tierversuch dar [81], die andere Möglichkeit besteht in der modellhaften Untersuchung der Migration mit Hilfe von Zellen aus Zellkulturen. Hierzu existieren wiederum prinzipiell drei verschiedene Ansätze, die im Folgenden genauer erläutert und dem Tierversuch gegenübergestellt werden.

Im Tierversuch wird ein Trägermaterial, zum Beispiel Matrigel [106], mit dem zu untersuchenden Faktor beladen und einem Tier subkutan implantiert. Nach einer definierten Zeit wird es wieder entfernt und auf die Anzahl eingewanderter Zellen hin untersucht [81]. Matrigel ist ein Extrakt aus dem Englebreth-Holm-Swarm-Tumor und enthält verschiedene Bestandteile der Basalmembran [127]. Der Vorteil dieser Methode ist in einem direkten Bezug zur Angiogenese zu sehen, denn die Vorgänge bei diesem Versuchsaufbau gehen über die reine Migration bereits hinaus und simulieren die Schritte, die zur Neubildung von Gefäßen in hypoxischem Gewebe führen. Andererseits wird aber ein relativ langer Zeitraum von 10 Tagen zur Durchführung benötigt. Damit sind Kurzzeiteffekte bestimmter Stimuli der Migration nicht zu differenzieren. Darüber hinaus ist eine Beobachtung von Teilschritten nicht möglich, und es ist auch nicht gewährleistet, daß die angestrebte Wirkstoffkonzentration über den gesamten untersuchten Zeitraum konstant bleibt. Über Diffusionsvorgänge kann das Implantat den zu untersuchenden Faktor an das angrenzende Gewebe abgeben. Umgekehrt können auch vom Tier selbst

sezernierte proangiogenetische Botenstoffe in das Implantat diffundieren. Schließlich erscheint bei dieser Methode auch eine genaue Differenzierung von Migrations- und Proliferationsvorgängen unmöglich.

Die Modellversuche mit kultivierten Endothelzellen bieten dem Tierversuch gegenüber einige Vorteile. So kann hier die Temperatur, eine wichtige Einflußgröße, bei 37°C und damit in einem physiologischen Bereich konstant gehalten werden. Auch die adäquate Begasung der Endothelzellen im Brutschrank ist gewährleistet. Zusätzliche Effekte durch Entzündungsvorgänge, die bei der Implantation von Fremdmaterial im Tierversuch eine Rolle spielen können, sind ausgeschlossen. Schließlich wird auch die Sekretion von anderen Botenstoffen durch benachbarte Zellen ausgeschlossen, da im Modellversuch sichergestellt werden kann, daß es sich bei den untersuchten Zellen ausschließlich um humane Endothelzellen handelt.

Bei den Modellversuchen mit Endothelzellen aus Zellkulturen existieren wiederum drei verschiedene Methoden. Die erste Methode besteht in einem experimentellen Zwei-Kammer-System, wie Stephen Boyden es 1961 zuerst beschrieben hat [26]. Dort werden zwei mit einer Nährlösung gefüllte Kompartimente durch eine für die Endothelzellen nur durch aktive Migration durchlässige Membran getrennt. Durch Zugabe des zu untersuchenden Faktors in das eine Kompartiment und der Endothelzellen in das andere Kompartiment wird ein definierter Konzentrationsgradient geschaffen. Die Beobachtung erstreckt sich über einen Zeitraum von 4-5 Stunden, so daß einerseits Kurzzeiteffekte auf die Migration untersucht werden können, andererseits aber auch ein störender Einfluß einer möglichen Endothelzellproliferation auf das Ergebnis ausgeschlossen wird.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der Endothelzellmigration besteht im sogenannten Scratch wound closure assay. In einer konfluenten Endothelzellschicht wird unter sterilen Bedingungen eine Läsion definierter Größe gesetzt. Nach einer festgesetzten Zeit wird die Anzahl der aus dem noch intakten Zellverband in die Wunde ausgewanderten Endothelzellen ausgezählt [74]. Dabei sind wie bei dem Zwei-Kammer-System nach Boyden sowohl Kurz- als auch Langzeiteffekte beobachtbar. Der ursprüngliche Ansatz der Scratch wound closure assays konnte hingegen nicht zwischen reiner Migration und zusätzlicher Proliferation differenzieren. Diesem Problem begegnete man in neueren Versuchen, indem man die Proliferation durch Zugabe von Inhibitoren des Zellwachstums, wie etwa Thymidin, unterband [127]. Dennoch ist diese Methode der modifizierten Boyden-Kammer unterlegen, da hier ein definierter Konzentrationsgradient nicht zu erhalten ist und es sich bei der beobachteten Migration daher eher um Effekte der Chemokinese, also der ungerichteten Zellbewegung, handelt, als um eine echte Chemotaxis. Der Ansatz der scratch wound closure assays entspricht am ehesten einem adäquaten Modell zur Untersuchung von Reparaturvorgängen nach Läsionen der Endothelzellschicht, wie sie etwa bei der Ballonangioplastie entstehen.

Eine neuere Methode sieht die Untersuchung des Verhaltens von Endothelzellen in dreidimensionalen Zellkultursystemen vor. Dieser Ansatz entspricht einer Weiterentwicklung des Tierversuchs, und auch hier werden eher Prozesse der Angiogenese nachempfunden, die sowohl die Migration als auch eine Proliferation der Zellen erfordert, als nur die Migration [37, 140].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Zwei-Kammer-System nach Boyden verwendet. Dies steht im Einklang mit dem Stand der Literatur, nach dem die modifizierte Boyden-Kammer das inzwischen meistgenutzte System zur Untersuchung von Migrationsvorgängen ist.

Als genereller Nachteil bei der Verwendung von Endothelzellen aus Zellkulturen läßt sich anführen, daß die Konditionen in der Zellkultur zwar so nah wie möglich an die physiologisch vorhandenen Bedingungen angepaßt wurden, ihnen jedoch niemals vollständig entsprechen konnten. So weisen Endothelzellen unter Kulturbedingungen eine hohe Proliferationsrate auf, die im Gegensatz zu dem geringen Zellumsatz der grundsätzlich ruhenden Endothelzellen im adulten Organismus steht. Diese starke Proliferation führt beispielsweise zur Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ auf den Endothelzellen, das auf ruhenden Zellen nicht exprimiert wird [28]. Im Gegensatz dazu gehen die Produktion von NO und die Synthese von Endothelial Cell Nitric Oxid Synthetase (ecNOS) unter den statischen Bedingungen der Zellkultur zurück, in denen die Endothelzellen nicht mehr den durch den Blutstrom bedingten mechanischen Kräften ausgesetzt sind [8]. Um diese zellkulturbedingten Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden die Endothelzellen unter konstanten Bedingungen kultiviert. Für die Versuche wurden nur Endothelzellen aus konfluenten Zellkulturen der zweiten bis vierten Passage verwendet.

4.3 Etablierung eines Migrationsassays für humane umbilikale Endothelzellen und Definition eines Versuchsmediums

Die zunächst durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, den Migrationsversuch nach Boyden [26] für die auch im Folgenden verwendeten humanen umbilikalischen Endothelzellen zu modifizieren, Einflüsse der Kulturbedingungen auf die Endothelzellmigration zu analysieren und in den folgenden Versuchen möglichst gering zu halten. Das für die Endothelzellkultur verwendete Medium enthielt als proliferationssteigernde Faktoren 20% FCS und 10 ng/ml a-FGF. FCS enthält ein Gemisch aus verschiedenen Stimulanzien des Endothelzellwachstums und steigert die Migration von Endothelzellen [179]. Hingegen sind in der Literatur nahezu keine Untersuchungen über die dabei beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion verfügbar.

Um den Einfluß von FCS auf die Migration humaner umbilikaler Endothelzellen zu analysieren, wurden in dieser Arbeit zunächst Migrationsversuche durchgeführt, bei denen die HUVEC für die Dauer der Migration in einem Versuchsmedium resuspendiert wurden, das nur 1% bzw. 2% FCS enthielt. Die Migration wurde durch Zugabe von 20% FCS in das untere Kompartiment des Zwei-Kammer-Systems stimuliert. Dies entsprach der FCS-Konzentration im normalen Kulturmedium. Die Versuche ergaben, daß die HUVEC bei den genannten niedrigen Konzentrationen von FCS im Versuchsmedium kaum migrierten und auch durch die Stimulation nicht zu einer signifikanten Migration durch den Filter des Zwei-Kammer-Systems anzuregen waren.

In einem nächsten Schritt wurde die FCS-Konzentration des Versuchsmediums auf 5% erhöht. Es erfolgten wiederum Migrationsversuche mit einer Stimulation durch 20% FCS. Hier kam es zu einer deutlich erkennbaren Migration, und es ergab sich eine signifikante Steigerung der Rate migrierter Zellen gegenüber nicht stimulierten HUVEC der Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigte, daß FCS in einer Konzentration von 20% ein starker Induktor der Endothelzellmigration ist. Außerdem erbrachte es die Erkenntnis, daß ein Versuchsmedium mit sehr geringen FCS-Konzentrationen die Zellfunktionen der für die Versuche verwendeten HUVEC offenbar so weit reduzierte, daß sich eine Migration selbst durch starke Stimuli nicht mehr induzieren ließ.

Darüber hinaus zeigte sich, daß die Vorbehandlung der HUVEC mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 die durch FCS induzierte Migration der HUVEC signifikant hemmte. Dies läßt den Schluß zu, daß die ERK1/2 MAPK an der Signaltransduktion der hier beobachteten promigratorischen Wirkung von FCS wesentlich beteiligt war. Weitere Untersuchungen sind aber erforderlich, da FCS ein Gemisch unterschiedlicher Proteine enthält, die Einfluß auf das biologische Verhalten von Endothelzellen haben [179].

Der zweite proliferationssteigernde Faktor, der dem Kulturmedium zugesetzt war, war a-FGF. Dabei handelt es sich um einen heparinbindenden Wachstumsfaktor für Endothelzellen, der aus einer Polypeptidkette von 140 Aminosäuren besteht [73]. A-FGF (oder FGF-1) kann als einziges Mitglied der FGF-Familie, die 9 verschiedene Ligan-

den umfaßt, an alle vier bekannten FGF-Rezeptoren binden und gilt deshalb zusammen mit b-FGF (synonym FGF-2) als Prototyp dieser Familie von Wachstumsfaktoren [21]. Die exogene Zugabe von a-FGF zum Kulturmedium ist für die Proliferation kultivierter Endothelzellen unentbehrlich [60]. In der Literatur ist beschrieben, daß a-FGF die Organisation der sogenannten „Focal Adhesion Sites“ (FAS) in Endothelzellen beeinflusst [60]. Darüber hinaus steigert a-FGF die Aktivität von Collagenase und die Produktion von Plasminogen-Aktivator, wogegen es die Sekretion von Plasminogen-Inhibitor hemmt [169, 136].

Invasivität und Reorganisation des Aktin-Myosin-Skeletts sind wichtige Voraussetzungen der Endothelzellmigration, und so wurde die chemotaktische Wirkung von a-FGF auf Endothelzellen in vitro bereits 1987 beschrieben [73]. Außerdem ist bekannt, daß a-FGF Einfluß auf die Differenzierung von Endothelzellen hat und beispielsweise für die adäquate Sekretion der verschiedenen Bestandteile der Basalmembran und damit für ihre korrekte Zusammensetzung unerlässlich ist [173]. Schließlich konnte eine wichtige Beteiligung von a-FGF an der Embryonalentwicklung gezeigt werden, die sich zum Beispiel darin zeigt, daß ein erblicher Defekt des FGFR-3 zur Achondroplasie führt [57].

Damit induziert a-FGF alle einzelnen Schritte der Angiogenese [165], und seine Schlüsselrolle bei der Bildung neuer Gefäße wurde in der Literatur vielfältig beschrieben. Über die Signaltransduktion der durch a-FGF induzierten Endothelzellmigration sind in der Literatur hingegen nur wenige Erkenntnisse beschrieben. Allerdings konnte für die durch b-FGF angeregte Migration von bovinen Endothelzellen aus der Aorta eine Beteiligung der ERK1/2 MAPK gezeigt werden [161].

Um nun den Einfluß der im Kulturmedium enthaltenen Konzentration von 10 ng/ml a-FGF auf die Endothelzellmigration zu untersuchen, wurden wie oben beschrieben Migrationsversuche mit Hilfe der modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt. Statt 20% FCS wurde nun a-FGF zur Stimulation eingesetzt. Es zeigte sich keine Stimulation der Migration in den Versuchen, in denen die HUVEC in nur 1% bzw. 2% FCS enthaltendem Versuchsmedium resuspendiert worden waren. Bei Verwendung eines Versuchsmediums mit 5% FCS induzierte 10 ng/ml a-FGF hingegen eine signifikante Steigerung der Rate migrierter Zellen gegenüber der Kontrolle und erwies sich so als Stimulus der Endothelzellmigration. Dies entsprach den aus der Literatur bekannten Ergebnissen.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Behandlung der HUVEC mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 die durch a-FGF induzierte Endothelzellmigration vollständig aufhebt. Dieses Ergebnis stellt die Bedeutung ERK1/2 MAPK als Schlüsselenzym der Signaltransduktion bei der durch a-FGF induzierten Migration von Endothelzellen heraus und bestätigt damit eine neuere Arbeit, in der die ERK1/2 MAPK als entscheidender Schritt der Endothelzellmigration nach Stimulation durch b-FGF identifiziert wird [161].

Zur Kontrolle der Chemokinese, also der ungerichteten „Hintergrundmigration“ der HUVEC, deren Einfluß auf die Ergebnisse der folgenden Stimulationen möglichst eliminiert werden sollte, wurde in allen weiteren Versuchen ein Ansatz verwendet, bei dem in beiden Kammern lediglich das Versuchsmedium mit 5% FCS enthalten war. Da sich ein besonders starker promigratorischer Effekt von 20% FCS auf die HUVEC gezeigt hatte,

wurden für alle folgenden Untersuchungen in einem weiteren Ansatz die im Versuchsmedium resuspendierten HUVEC mit 20% FCS stimuliert und die dadurch angeregte Rate migrierter Zellen als Positivkontrolle für das Migrationspotential der jeweils verwendeten Zellpräparation gewertet.

Die zunächst durchgeführten Untersuchungen ergaben damit, daß der Migrationsversuch nach Boyden auch für die in dieser Arbeit verwendeten HUVEC reproduzierbare Ergebnisse erbrachte und damit eine geeignete Methode zur Analyse stimulierender bzw. hemmender Faktoren der Endothelzellmigration darstellt. Außerdem zeigte sich, daß die dem Kulturmedium zugesetzten Wachstumsfaktoren FCS und a-FGF selbst chemotaktisch auf die HUVEC wirken und damit Störfaktoren für die Untersuchung des promigratorischen Einflusses weiterer Faktoren darstellen. Andererseits war ein geringer Zusatz von 5% FCS auch zum Versuchsmedium unentbehrlich, da ansonsten die Induktion der Endothelzellmigration nicht mehr möglich war. Als Folgerung aus diesen Ergebnissen wurde im Sinne eines Kompromisses als Versuchsmedium für alle folgenden Versuche Medium 199 Earle + 5% FCS (ohne a-FGF) festgesetzt.

4.4 Einfluß von VEGF auf die Endothelzellmigration

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche hatten zum Ziel, den Einfluß von VEGF auf die Migration humaner umbilikaler Endothelzellen zu analysieren und Schritte der dabei beteiligten Signaltransduktion näher zu definieren.

4.4.1 Biologische Wirkungen von VEGF

VEGF ist ein endothelzellspezifisches Mitogen, das aufgrund seiner Fähigkeit zur Steigerung der Gefäßpermeabilität bei seiner erstmaligen Beschreibung VPF (=Vascular Permeability Factor) genannt wurde [175]. Im Jahre 1989 wurde es dann zeitgleich von zwei Gruppen isoliert und in seiner Struktur genauer charakterisiert und erhielt den heute gebräuchlichen Namen VEGF [72, 48].

VEGF ist ein basisches, heparinbindendes Glykoprotein einer Größe von 46 kDa, das aus zwei identischen durch Disulfidbrücken verbundenen, antiparallelen Monomeren besteht. Inzwischen sind fünf verschiedene Isoformen von VEGF beschrieben worden, die durch alternatives Splicing eines einzigen Gens entstehen und sich in ihrer Fähigkeit zur Bindung von Heparin und in ihrer biologischen Potenz unterscheiden. VEGF₁₆₅ gilt als die am weitesten verbreitete und die biologisch aktivste Isoform. Außerdem wird noch der Placenta-derived Growth Factor (PlGF) zur VEGF-Familie gerechnet [47, 142].

Eine Vielzahl von Zellen ist zur Produktion von VEGF fähig, so zum Beispiel glatte Gefäßmuskulzellen [35], Endothelzellen [207] und verschiedene Tumoren [11].

Die Produktion von VEGF wird durch verschiedene Faktoren hochreguliert, zum Beispiel durch Sauerstoffmangel über die durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktoren der HIF-Klasse, durch andere Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor

(EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Insulin-like Growth Factor (IGF-1), durch an Entzündungsprozessen beteiligte Faktoren wie IL-6, durch verschiedene Onkogene und durch b-FGF [142]. Auch der Ausfall von Tumor-Suppressor-Genen wie des p53 bewirkt eine vermehrte Produktion von VEGF [103]. Eine negative Regulation von VEGF erfolgt beispielsweise durch IL-10 und IL-13 [142].

Als Rezeptoren für VEGF wurden der sogenannte VEGF-R1 (flt-1) [205] und der VEGF-R2 (KDR) [199] isoliert und beschrieben. Diese beiden Rezeptoren sind fast ausschließlich auf Endothelzellen vorhanden. Darüber hinaus existieren noch ein VEGF-R3, der aber nur in Lymphgefäßen exprimiert ist, und verschiedene Korezeptoren, die Neuropiline, für die eine eigene Signaltransduktion noch nicht gezeigt werden konnte. Zur Ausbildung einer festen Bindung zwischen VEGF und seinen Rezeptoren sind außerdem noch Heparansulfat-Proteoglykane erforderlich [142].

Die VEGF-Rezeptoren bestehen jeweils aus 7 extrazellulären Domänen mit Ähnlichkeit zu Immunglobulinen, einer die Membran durchspannenden Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase [178, 198]. Die Bindung von VEGF an seine endothelzell-spezifischen Rezeptoren flt-1 und KDR führt zu Änderungen der Konformation beider Rezeptoren und über eine Dimerisierung zur Autophosphorylierung [114]. Auch die VEGF-Rezeptoren werden durch Hypoxie verstärkt exprimiert. Dies steht im Einklang mit der starken proangiogenetischen Wirkung von VEGF [47]. Ein negativer Einfluß auf die Expression von KDR und flt-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen konnte für $\text{TNF}\alpha$ gezeigt werden [152]. Waltenberger benannte den VEGF-R2 KDR als den für die Endothelzellmigration entscheidenden [206].

Die wichtigste Funktion von VEGF ist die Regulation von Angiogenese und Vaskulogenese [47]. So resultierte zum Beispiel die Ausschaltung von VEGF durch einen defekten Rezeptor flt-1 im Tierversuch im Ausbleiben der Differenzierung von Endothelzellen aus den Hämangioblasten, den gemeinsamen Vorläuferzellen von Endothelzellen und Blutzellen, und im intrauterinen Tod [53]. Auch die experimentelle Ausschaltung von KDR führte zu schweren Entwicklungsstörungen und zum intrauterinen Tod [177].

Zur Induktion der Angiogenese sind verschiedene Schritte erforderlich: Die Migration von Endothelzellen, deren Proliferation und Differenzierung [28]. VEGF ist als starker Induktor der Angiogenese in der Lage, sämtliche dieser Einzelschritte zu initiieren. So stimuliert es beispielsweise die Migration von Endothelzellen über eine Änderung der Zellmorphologie und über die Umstrukturierung der Aktin-Fasern des Zytoskeletts. Darüber hinaus ist eine chemotaktische Wirkung von VEGF auf Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs beschrieben [206, 30, 179, 218, 167, 39].

In engem Zusammenhang mit der Endothelzellmigration und -invasivität steht auch die vermehrte Expression von MMPs, die eine Degradation der extrazellulären Matrix bewirken [203, 115], und des Plasminogen-Aktivators u-PA [30, 154] nach Stimulation der Endothelzellen mit VEGF. Außerdem wurde eine antiapoptotische Wirkung von VEGF auf Endothelzellen beschrieben, die durch Induktion der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 und durch Aktivierung des PI3K/Akt/PKB-Wegs vermittelt wird [61, 62].

Die Wege der Signaltransduktion VEGF-vermittelter Effekte sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Aktivierung der ERK1/2 MAPK über einen Phospholipase C (PLC γ)- und Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Weg ist inzwischen gut gesichert [174, 82, 192]. Weiterführende Untersuchungen haben erbracht, daß die VEGF-induzierte Aktivierung der ERK1/2 ausschließlich durch den VEGF-R2 (KDR) vermittelt wird, und zwar über den Weg KDR/ Shc/ Grb2/ Sos/ Ras/ ERK1/2-MAPK, und so zur Endothelzellproliferation beiträgt [114]. Es wurde aber noch ein weiterer, NO-abhängiger Weg der Aktivierung der ERK1/2-MAPK beschrieben: KDR/ Ca²⁺/ eNOS/ NO/ cGMP/ ERK1/2-MAPK. Auch in dieser Arbeit wurde der Einfluß der ERK1/2 auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht [150].

Zur Beteiligung der ERK1/2 an der VEGF-induzierten Endothelzellmigration liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In einer Arbeit wird die Beteiligung der ERK1/2 an der Signaltransduktion des promigratorischen Effekts von VEGF über den Weg ERK1/2 / PLC γ / Focal Adhesion Kinase (FAK) / Paxillin postuliert [1], wogegen in anderen Arbeiten gegensätzliche Ergebnisse vorgestellt werden. Dort wird ein Einfluß der ERK1/2 auf die VEGF-induzierte Endothelzellmigration ausgeschlossen [220, 221]. Stattdessen wird aber ein direkter Einfluß der p38 MAPK auf die Bildung von sogenannten „Stress Fibers“ beschrieben, einer wichtigen Voraussetzung der Zellmotilität [167, 166, 187]. In einer neueren Arbeit wird vorgeschlagen, daß der VEGFR-1 (flt-1) über die p38 MAPK die Ausbildung von Stress Fibers induziert, wohingegen der VEGFR-2 (KDR) eine Phosphorylierung der FAK über einen PKC-abhängigen, aber von der ERK1/2 unabhängigen Weg bewirkt [98].

Auch andere Wege der Signaltransduktion werden diskutiert. So wird beispielsweise berichtet, daß die Endothelzellmigration über einen NO-abhängigen Weg nach Bindung von VEGF an flt-1 induziert wird: flt-1/eNOS/NO/PKC δ . Dabei wurde gemäß den dort vorgestellten Ergebnissen die Menge von PKC δ nicht beeinflusst, sondern es handelte sich lediglich um eine posttranskriptionelle und posttranslationelle transiente Aktivitätsminderung dieser Kinase [179]. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu früheren Arbeiten, nach denen ausschließlich der VEGF-R2 (KDR) für die Induktion der Endothelzellmigration von Bedeutung sein soll [206]. Außerdem war die verwendete Methode die eines „scratch wound closure“- Versuchs, bei dem nicht genau zwischen reiner Migration und zusätzlicher Proliferation der Endothelzellen differenziert werden konnte. Die Aktivitätsminderung der PKC δ setzte zudem erst nach einer Stimulation von 8 h Dauer ein und erreichte ihr Maximum nach 16 h. Damit entsprach der untersuchte Zeitraum nicht der bei der hier vorgestellten Arbeit und bei anderen Versuchen unter Verwendung der modifizierten Boyden-Kammer verwendeten Zeitspanne von 4 h. Dennoch wird auch in anderen Arbeiten über die Bedeutung von NO in der Vermittlung von promigratorischen und proangiogenetischen Signalen durch VEGF berichtet [225], und für NO wird ein direkter regulierender Einfluß auf die Phosphorylierung der an der Endothelzellmigration beteiligten FAK beschrieben [70]. Darüber hinaus wurde auch für die PKC und den Vitronectin-Rezeptor $\alpha v \beta 5$ eine Beteiligung an der Signaltransduktion durch VEGF postuliert [176, 56].

In neueren Arbeiten wurde die entscheidende Bedeutung der Proteinkinase Akt für die VEGF-induzierte Endothelzellmigration herausgestellt. Die VEGF-induzierte Aktivie-

rung der Akt führt zur Reorganisation des Zytoskeletts aus Aktin und Myosin und damit zur Motilität der Endothelzellen [138, 39, 134]. Außerdem konnte eine antiapoptotische Wirkung von Akt in Endothelzellen gezeigt werden, ein weiterer die Angiogenese begünstigender Aspekt [40].

4.4.2 ERK1/2-MAPK-abhängige Induktion der Endothelzellmigration durch VEGF

Die an der Endothelzellmigration beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion sind noch nicht vollständig geklärt. Sie umfassen sowohl zytosolische als auch nukleäre Signale. So stellen die ERK1/2 MAPK Schlüsselenzyme dar, die die Migration von Zellen vaskulären und nicht-vaskulären Ursprungs regulieren [68, 195, 31, 33]. Dabei translozieren die aktivierten MAPK sowohl zum Nukleus als auch zum Zytoskelett [71]. Es wurde gezeigt, daß die Aktivierung der ERK1/2 über Rezeptoren für Integrine oder Wachstumsfaktoren direkten Einfluß auf die Zellmigration hat: Die ERK1/2 MAPK aktiviert die Myosin Light Chain Kinase (MLCK), die wiederum die leichten Myosinketten (MLC) phosphoryliert und damit die zur Zellkontraktion benötigte Energie liefert und die Reorganisation des Aktin-Myosin-Zytoskeletts bewirkt [31, 33]. Dabei haben die ERK1/2 keinen Einfluß auf die Regulation der Adhäsion von Zellen an der ECM, ein weiterer wichtiger Einflußfaktor bei der Zellmigration [107]. Dagegen haben die ERK1/2 noch weitere, über diese zytosolischen Effekte hinausgehende, Regulationsfunktionen. Sie translozieren nach ihrer Aktivierung zum Nukleus und phosphorylieren dort multiple Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Transkription von Genen regulieren, die den Zellzyklus und das Verhalten der Zelle steuern [5, 64]. Eine der nukleären Zielstrukturen der aktivierten ERK1/2 ist der Transkriptionsfaktor Ets-1 [195, 184], der die Expression von verschiedenen Matrixmetalloproteasen und damit eine gesteigerte Invasivität von Endothelzellen induziert [145] [95]. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, daß die Inhibition des ERK1/2-Wegs die Produktion von Matrixmetalloproteasen und die Migration von vaskulären und nicht-vaskulären Zellen hemmt [32, 105]. Unter den zytosolischen Mechanismen der Signaltransduktion spielt die Proteinkinase Akt eine entscheidende Rolle bei der VEGF-induzierten Endothelzellmigration [39, 138]. Sie reguliert die Reorganisation des Aktin/Myosin-Zytoskeletts und damit einen wichtigen Faktor der Zellmotilität [138, 134, 208]. Überdies stellt die Aktivierung der Proteinkinase Akt ein antiapoptotisches Signal für Endothelzellen dar, ein weiterer Faktor, der mit Migration und Angiogenese in Verbindung gebracht wird [40].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die vielfach beschriebene Steigerung der Endothelzellmigration durch VEGF. Es konnte eine dosisabhängige signifikante Induktion der Endothelzellmigration durch VEGF gegenüber der Kontrolle gezeigt werden, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 10 ng/ml VEGF erreichte. In den daraufhin durchgeführten Western Blots zeigte sich, daß die VEGF-Stimulation in den HUVEC eine transiente Aktivierung der ERK1/2 mit Maximalwerten nach einer Dauer von 10 min. bewirkte. Um nun die Beteiligung der ERK1/2 an der VEGF-vermittelten Endothelzellmigration zu zeigen, wurden die Migrationsversuche unter Zugabe von PD 98059

wiederholt, einem spezifischen Inhibitor der MEK, die der ERK1/2 unmittelbar vorgeschaltet ist [4, 42]. PD 98059 hob sowohl die Aktivierung der ERK1/2 in den Endothelzellen als auch die promigratorische Wirkung von VEGF vollständig auf.

Damit tritt die ERK1/2 MAPK in dieser Arbeit als ein Schlüsselenzym der VEGF-induzierten Endothelzellmigration in Erscheinung, dessen Blockade die Wirkung von VEGF nahezu aufhob.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in diesem Punkt im Widerspruch zu neueren Veröffentlichungen, in denen ein Einfluß der ERK1/2 auf die Endothelzellmigration verneint und die ERK1/2 eher im Mittelpunkt proliferatorischer Reaktionen gesehen wird [98, 220, 221]. Bisher ist ebenfalls nicht geklärt, welcher der beiden VEGF-Rezeptoren die Induktion der Endothelzellmigration durch VEGF vermittelt oder ob beide Rezeptoren an dieser Reaktion beteiligt sind: Während Waltenberger noch den VEGFR-2 (KDR) als den für die Endothelzellmigration einzig entscheidenden identifizierte [206], beschreibt eine neuere Arbeit die Beteiligung auch des VEGFR-1 (flt-1) an der VEGF-induzierten Endothelzellmigration [98]. Angesichts der widersprüchlichen Aussagen, die in der Literatur zur Rolle der ERK1/2 in der VEGF-induzierten Endothelzellmigration zu finden sind, werden noch weitere Untersuchungen erforderlich sein, um die dabei beteiligten Wege der Signaltransduktion genauer aufzuschlüsseln und die Position der ERK1/2-MAPK im Zusammenspiel der unterschiedlichen Signale zu bestimmen.

4.5 Einfluß von Leptin auf die Endothelzellmigration

4.5.1 Biologische Wirkungen von Leptin

Leptin ist ein Hormon einer Größe von 16 kDa mit vielen verschiedenen biologischen Wirkungen, das zunächst im Zusammenhang mit der Regulation des Körpergewichts beschrieben wurde. So wird Leptin hauptsächlich von Adipozyten sezerniert, und die zirkulierenden Leptin-Spiegel im Blut korrelieren mit den Fettspeichern im Körper und dem Körpergewicht [125]. Dagegen sinkt der Leptin-Spiegel nach einigen Stunden der Nahrungskarenz sowohl im Nagetier als auch beim Menschen [23].

Die Regulation der Leptin-Spiegel unterliegt außerdem direkten Einflüssen verschiedener Stimuli, darunter Glukokortikoide, Insulin und Zytokine [183, 3]. Darüber hinaus unterliegen die Leptin-Spiegel im Blut zirkadianen Schwankungen [181, 3]. Im Tierversuch bewirkten Leptin-Injektionen eine deutliche Senkung der Nahrungsaufnahme, einen gesteigerten Energieverbrauch, der zum Teil über eine Steigerung der Thermogenese zustande kam, und eine Entleerung der Fettspeicher und Reduktion des Körpergewichts [83]. Es wurde gezeigt, daß Leptin im Zusammenspiel mit anderen Regulatoren des Stoffwechsels vor allem durch Bindung an spezifische Rezeptoren im Hypothalamus wirkt [43]. Zusammenfassend wurde Leptin daher als im Blut zirkulierender „Sättigungsfaktor“ bezeichnet [3].

Leptin ist ein Polypeptid aus 146 Aminosäuren und wird vom ob-Gen kodiert und überwiegend in weißem Fettgewebe gebildet [224]. Strukturanalysen ergaben, daß es die helikale Struktur eines Zytokins besitzt [222].

Der Leptin-Rezeptor ist das Produkt des db-Gens und wurde im Jahre 1995 zuerst beschrieben [197]. Er ist ein einfach die Zellmembran durchspannender Rezeptor aus der Familie der Klasse I - Zytokin-Rezeptoren, und es wurde eine ausgeprägte Homologie und nahe Verwandtschaft zu anderen Rezeptoren dieser Familie wie gp130, Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSFR) und Leukemia Inhibitory Factor (LIFR) gefunden [196]. Inzwischen wurden sechs verschiedene Leptinrezeptoren identifiziert, deren extrazelluläre Domänen identisch sind und die sich nur in ihren intrazellulären Domänen unterscheiden [3].

Eine grobe Einteilung unterscheidet lediglich zwischen einer langen und einer kurzen Form des Leptinrezeptors, OB-Rl und OB-Rs. Die lange Form des Leptinrezeptors besitzt, wie die anderen Rezeptoren aus der Familie der Klasse I - Zytokin-Rezeptoren, keine eigene Tyrosin-Kinase-Aktivität und vermittelt die Signaltransduktion über den JAK-STAT-Pathway, wobei eine Aktivierung von STAT 3 und STAT 5 bereits in mehreren Publikationen beschrieben wurde [12, 63, 196, 210, 209]. Für OB-Rs, die kurze Form des Leptinrezeptors, ist eine Signaltransduktion nicht gesichert, und so wurde vermutet, daß er lediglich zum Transport von Leptin ins ZNS oder zu anderen Transportvorgängen wie auch zur Entfernung von Leptin aus dem Blut und zu seinem Abbau dient [196]. Tatsächlich besteht für Leptin ein spezifischer und sättigbarer Transportmechanismus vom Plasma in den Liquor, und der OB-Rs ist in hoher Dichte auf den Zellen des Plexus

choroideus exprimiert [9]. Einer dritten Form des Leptinrezeptors fehlt die intrazelluläre Domäne vollständig. Dieser Rezeptor wurde als OB-Re bezeichnet und dient der Regulation des Gleichgewichts zwischen freiem und proteingebundenem Leptin, das wiederum für die biologische Aktivität von Leptin verantwortlich ist [182]. Neben dem JAK-STAT-Weg wurden aber noch weitere Wege der Signaltransduktion für OB-Rl beschrieben: So kommt es durch seine Aktivierung zur Phosphorylierung der MAPK [20, 193, 194] und zur Aktivierung des PI3K-Akt-Wegs [6].

Während die kurze Form des Leptinrezeptors, OB-Rs, in vielen verschiedenen Geweben wie Niere, Leber, Lunge und Milz und auf Makrophagen exprimiert ist [46], wurde die lange Form, OB-Rl, vor allem im Hypothalamus nachgewiesen und mit der Regulation des Körpergewichts in Verbindung gebracht [210]. Aber auch auf HUVEC und verschiedenen Endothelzellen anderen Ursprungs wurde ein funktioneller OB-Rl nachgewiesen [24, 180, 214].

Bei Übergewichtigen wurden ständig erhöhte Leptin-Werte festgestellt, die in Verbindung mit Hyperinsulinämie und Insulinresistenz auftraten, Bedingungen also, die bei Patienten mit Diabetes Typ II - oder NIDDM - gefunden werden [181, 226]. In Analogie zum Entstehungsmechanismus des NIDDM wurde zur Erklärung der Hyperleptinämie bei Übergewichtigen eine Leptin-Resistenz postuliert [19, 49].

Erhöhte Leptin-Plasmaspiegel wurden auch mit essentieller Hypertonie in Verbindung gebracht: So wurden bei Patienten mit essentieller Hypertonie höhere Leptinkonzentrationen im Blut gemessen als bei Normotonikern [2], und ein Erklärungsansatz besteht im durch Leptin gesteigerten Sympathikotonus, der wiederum die Erhöhung des Blutdrucks bewirkt [86].

Zusätzlich zur Stoffwechselregulation wurden periphere Wirkungen von Leptin beschrieben: So spielt Leptin eine Rolle in der Regulation des Immunsystems und von Entzündungsprozessen, und die Leptin-Spiegel im Blut steigen durch die Einwirkung von Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 rasch und vorübergehend an [46]. In HUVEC bewirkt Leptin die Freisetzung des für Makrophagen chemotaktischen Botenstoffes MCP-1, ein Vorgang, der mit der Entstehung atherosklerotischer Plaques in Verbindung gebracht wird [25]. Auch im geregelten Ablauf der Hämatopoese und für Reproduktionsfunktionen spielt Leptin eine Rolle [46]. Darüber hinaus beschleunigt Leptin die Wundheilung sowohl bei diabetischen als auch bei gesunden Mäusen, und die lange Form seines Rezeptors, OB-Rl wurde auf Keratinozyten nachgewiesen [54, 162]. Leptin ist ein starker proangiogenetischer Faktor, und eine Steigerung der Angiogenese durch Leptin-Stimulation wurde in vivo und in vitro beschrieben [24, 180].

Die lange Form des Leptinrezeptors, OB-Rl, wird von Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs und auch von HUVEC exprimiert und ist funktionell aktiv [24]. Daraus kann man auf direkte Wirkungen von Leptin auf Endothelzellen schließen, die durch den spezifischen Rezeptor und nicht etwa über die parakrine Wirkung sekundärer Botenstoffe vermittelt werden. Ein wichtiger Teilschritt der Angiogenese besteht in der Proliferation von Endothelzellen, und für Leptin wurde ein starker mitogener Effekt auf HUVEC in vitro nachgewiesen, der in Verbindung mit der Aktivierung der JAK, von STAT 3 und 5, und der ERK1/2 MAPK auftritt. Darüber hinaus hat Leptin eine antiapopto-

tische Wirkung auf Endothelzellen [24, 180]. Es wurde außerdem gezeigt, daß Leptin dosisabhängig die Endothelzellmigration steigert [180], jedoch liegen über die dabei beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion noch kaum gesicherte Erkenntnisse vor. Die Expression von Matrixmetalloproteinasen ist ein wichtiger Faktor für die Invasivität von Endothelzellen, für ihre Fähigkeit also, die Basalmembran zu degradieren und aus dem vorher festen Zellverband auszuwandern. Damit ist sie neben anderen Vorgängen für die Endothelzellmigration erforderlich. Leptin steigert in Endothelzellen sowohl die Expression der MMPs 2 und 9 als auch die ihrer Inhibitoren, TIMP-1 und TIMP2, und ist damit vermutlich am Ab- und Umbau der Basalmembran beteiligt [151].

Zusammenfassend wird Leptin mit angiogenetischen und proatherosklerotischen Vorgängen in Verbindung gebracht, die gerade bei solchen Krankheiten auftreten, die auch mit erhöhten Leptin-Spiegeln im Blut einhergehen, wie etwa bei NIDDM oder bei essentieller Hypertonie. Ein direkter Zusammenhang zwischen pathologisch erhöhten Leptin-Spiegeln und hypertensiver Retinopathie wird diskutiert [202].

4.5.2 Leptin stimuliert die Endothelzellmigration über eine Aktivierung der Proteinkinasen ERK1/2-MAPK und Akt

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von Leptin auf die Migration von HUVEC zu untersuchen und die dabei beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion näher zu definieren. In den durchgeführten Migrationsversuchen erwies sich Leptin als ein potenter Stimulus der Endothelzellmigration. Die Induktion der Endothelzellmigration durch Leptin war dosisabhängig, und in einer Konzentration von 50 ng/ml induzierte Leptin eine maximale Steigerung der Rate migrierter Zellen. Diese Konzentration entspricht physiologisch vorkommenden Leptin-Spiegeln bei Übergewichtigen [181].

Im direkten Vergleich zu VEGF war die migrationsinduzierende Wirkung von Leptin auf die untersuchten humanen umbilikalen Endothelzellen allerdings geringer. Analog zu VEGF bewirkte Leptin eine transiente Aktivierung und Phosphorylierung der ERK1/2 MAPK, die ihr Maximum nach einer Dauer der Stimulation von 10 min. erreichte. Die Behandlung der HUVEC mit dem spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 hemmte sowohl die durch Leptin induzierte Aktivierung der ERK1/2 als auch seine promigratorische Wirkung auf die Endothelzellen bzw. hob sie in der Konzentration von 30 μ M PD 98059 vollständig auf.

Die Proteinkinase Akt beeinflusst die Zellmotilität durch die Reorganisation des Zytoskeletts aus Aktin und Myosin und ermöglicht so die Migration von Endothelzellen [134, 138]. Sie stellt einen entscheidenden regulierenden Faktor in der Angiogenese dar [40]. Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob die Proteinkinase Akt auch an der durch Leptin vermittelten Endothelzellmigration beteiligt ist. Und tatsächlich erbrachten die folgenden Migrationsversuche, daß die Leptin-induzierte Migration humaner umbilikaler Endothelzellen auch durch den spezifischen Inhibitor des PI3K/Akt-Wegs, Wortmannin, dosisabhängig und signifikant gehemmt wird [146, 215].

In den sich nun anschließenden Western Blot-Analysen zeigte sich, daß Leptin die Proteinkinase Akt in den untersuchten humanen umbilikalen Endothelzellen in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation und mit einem Maximum nach 30 min. aktivierte. 100 ng/ml Wortmannin hoben die Aktivierung und Phosphorylierung von Akt durch Leptin vollständig auf. Damit erwies sich die Proteinkinase Akt als Schlüsselmechanismus der Leptin-induzierten Endothelzellmigration. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Entdeckung, daß Leptin die Invasivität und Migration von Epithelzellen aus dem Verdauungstrakt und der Niere über einen PI3K/Akt-abhängigen Weg steigert [6].

Der spezifische MEK-Inhibitor PD 98059 hatte keinen Einfluß auf die Aktivierung der Proteinkinase Akt. Dies führt zu dem Schluß, daß es sich bei den zytosolischen Kinasen ERK1/2 und Akt um zwei unabhängige Wege der Signaltransduktion promigratorischer Stimuli in Endothelzellen handelt.

Damit wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Leptin ein potenter Stimulus für die Endothelzellmigration ist. Außerdem konnte die Beteiligung mindestens zweier voneinander unabhängiger Wege der Signaltransduktion an der durch Leptin induzierten Endothelzellmigration nachgewiesen werden, und zwar der Proteinkinasen ERK1/2 und Akt. Blockierung eines dieser beiden Wege führte jeweils zu einer starken Hemmung der Migration von HUVEC nach Leptin-Stimulation. Die Aktivierung der ERK1/2-MAPK und der Proteinkinase Akt ist für die Migration von Endothelzellen jeweils erforderlich, aber nicht ausreichend.

4.6 Einfluß der Thiazolidinedione auf die Endothelzellmigration

4.6.1 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

Die in den hier vorgestellten Versuchen eingesetzten antidiabetischen Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone gehören zur Klasse der PPAR γ -Liganden. Die PPARs - oder Peroxisome Proliferator Activated Receptors - stellen eine Gruppe von nukleären Rezeptoren aus der Familie der Steroidrezeptoren dar, die zu Beginn der 1990er Jahre entdeckt wurde [128]. Sie wirken als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die nach der Bildung von Heterodimeren mit dem Retinoid X Receptor (RXR) die Expression verschiedener Gene steuern [102, 109, 110].

Den aktuellen mechanistischen Vorstellungen zur Wirkungsweise der PPARs liegt folgendes Modell zugrunde: Im nicht aktivierten Zustand liegen sie - an Co-Suppressoren gebunden - im Zytoplasma vor. Nach Bindung ihrer Liganden und die dadurch erfolgende Aktivierung der PPARs resultiert die Trennung von den Co-Suppressoren und die Zusammenlagerung mit verschiedenen Co-Aktivatoren. In diesem Zustand translozieren die PPARs in den Nukleus, wo sie sich an PPREs (PPAR-Response Elements) binden und dort über die Induktion bzw. Hemmung der Gentransduktion das Verhalten der

betroffenen Zellen regulieren [18]. Dabei ist die Bildung von Heterodimeren mit RXR für die Bindung der PPARs an die PPREs erforderlich [36].

Bislang sind drei verschiedene PPARs beschrieben worden, die durch unterschiedliche Expression in den verschiedenen Geweben charakterisiert sind und mit verschiedenen biologischen Wirkungen in Verbindung gebracht werden. PPAR α ist in metabolisch aktiven Geweben wie Niere, Leber, Skelettmuskulatur und Herz vorhanden [7] und wurde zunächst mit der Regulation des Fettstoffwechsels in Verbindung gebracht, insbesondere mit der β -Oxidation von Fettsäuren und dem Cholesterinmetabolismus [212, 213]. Die Aktivierung von PPAR α führte bei Nagetieren - nicht aber beim Menschen - zur Proliferation von Peroxisomen, woher sich der Name dieser Rezeptorfamilie erklärt [94]. Als natürlich vorkommende Liganden für PPAR α wurden sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren beschrieben [76].

Die therapeutisch eingesetzten Fibrate sind synthetische PPAR α -Liganden und senken die Triglyceride im Serum, wogegen sie den HDL-Spiegel erhöhen, beides kardioprotektive Faktoren [44]. Darüber hinaus wurde aber noch eine entzündungshemmende Wirkung von PPAR α beschrieben, indem es beispielsweise über eine Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B die Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen hemmt und die Expression von IL-6 vermindert [200]. Außerdem wurde neben der lipidsenkenden Wirkung der Fibrate noch eine Verbesserung der Glukosetoleranz bei Patienten mit Diabetes Typ-2 beschrieben [93].

Der zweite Rezeptor aus der Gruppe der PPARs ist PPAR δ , der ubiquitär verbreitet ist. Allerdings konnten bisher weder spezifische Liganden mit hoher Affinität noch eigene biologische Wirkungen für PPAR δ identifiziert werden, so daß seine Rolle noch weitgehend ungeklärt ist [36, 212].

Der dritte nukleäre Rezeptor dieser Rezeptorfamilie ist PPAR γ , der im Jahre 1992 entdeckt und zunächst nur in Adipozyten nachgewiesen wurde [41]. Die Aktivierung von PPAR γ spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten aus Vorläuferzellen, und in Experimenten, in denen PPAR γ forciert in Fibroblasten exprimiert wurde, führte seine Aktivierung durch schwache Liganden zur Umdifferenzierung dieser Zellen in voll ausgereifte Adipozyten [201].

4.6.2 Biologische Wirkungen von PPAR γ

PPAR γ reguliert mehrere Gene des Energiehaushalts und des Lipidstoffwechsels und trägt so zur Glukose- und Lipidhomöostase bei [212]. Er ist unter den PPARs der Rezeptor mit der höchsten Spezifität, und so treten als natürliche Liganden vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Metabolite von Prostaglandinen in Erscheinung [36]. Der natürliche Ligand für PPAR γ mit der höchsten Affinität und der stärksten biologischen Potenz ist das Prostaglandin-Derivat 15d-PGJ₂, allerdings ist die Spezifität nicht entsprechend hoch, und so existieren noch andere Wege der Signaltransduktion für diesen PPAR-Liganden [108, 171].

Die antidiabetischen Thiazolidinedione stellten sich als hochspezifische synthetische Liganden für PPAR γ heraus [118]. So sind aus dieser Gruppe Rosiglitazone und Pioglitazone im therapeutischen Einsatz [102, 160]. Troglitazone wurde in den USA und in Großbritannien vom Markt genommen und findet auch in Deutschland zur Zeit keinen therapeutischen Einsatz, nachdem bei einer geringen Anzahl von Patienten Lebertoxizität nachgewiesen wurde [186, 212].

Die Thiazolidinedione werden bei Patienten mit Diabetes Typ-2 eingesetzt, weil sie über verschiedene Mechanismen die Insulinsensitivität in der Muskulatur erhöhen und so die Glukose-, Insulin- und Lipidspiegel im Plasma effektiv senken [90, 102, 186]. Für Troglitazone ist überdies eine Senkung der Triglyceride und freien Fettsäuren im Plasma und eine Senkung des Blutdrucks sowohl bei Diabetikern als auch bei Nicht-Diabetikern beschrieben [185]. Die Aktivierung von PPAR γ führt zur Hemmung der ob-Expression und damit zur Senkung der Leptin-Spiegel [204].

PPAR γ wurde inzwischen auch in peripheren Geweben nachgewiesen, die keinen direkten Bezug zu den oben angeführten Stoffwechselvorgängen haben. So ist PPAR γ beispielsweise in glatten Gefäßmuskelzellen und in Makrophagen exprimiert, und analog zu PPAR α sind auch für PPAR γ entzündungshemmende Wirkungen beschrieben worden: So senkt es über die Inhibition der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT-1 und AP-1 die Expression von Entzündungsmediatoren wie TNF α , IL-1 und IL-6 [102]. Überdies ist eine Reduktion der Synthese von MMP-9 in Makrophagen durch PPAR γ beschrieben, ein entzündungshemmender Faktor, der als Schutz vor der Ruptur atherosklerotischer Plaques angesehen wird [132, 159]. Eine Hemmung der MMP-9-Expression durch den PPAR γ -Liganden Troglitazone ist auch für glatte Gefäßmuskelzellen beschrieben worden, die eine Erklärung für die schon früher beobachtete Hemmung der Migration dieser Zellen lieferte. Dieser Einfluß stellt einen weiteren wichtigen Schutzmechanismus vor der Entstehung atherosklerotischer Plaques dar [116, 131].

PPAR γ ist auch in Endothelzellen exprimiert [130]. Für den natürlichen PPAR γ -Liganden 15d-PGJ2 und für das Thiazolidinedion Ciglitazone wurde eine antiangiogene Wirkung sowohl in vitro als auch in vivo beschrieben [216]. Dieses Ergebnis wird durch eine neuere Arbeit bestätigt, in der die hemmende Wirkung der synthetischen PPAR γ -Liganden Troglitazone und Rosiglitazone auf die choroidale Neovaskularisation gezeigt wird. Überdies wird dort nachgewiesen, daß PPAR γ die VEGF-induzierte Migration und Proliferation von choroidalen Endothelzellen hemmt [141], ein Befund, der gut mit der früheren Entdeckung in Einklang zu bringen ist, daß die Behandlung mit PPAR γ -Liganden der Expression beider VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen entgegenwirkt [170].

4.6.3 Thiazolidinedione hemmen die Leptin-induzierte Endothelzellmigration durch Inhibition der Proteinkinase Akt

Über die Rolle von PPAR γ auf die Leptin-induzierte Endothelzellmigration liegen hingegen noch keine Erkenntnisse vor. Daher war es ein Ziel der hier vorgelegten Arbeit, den

Einfluß der synthetischen PPAR γ -Liganden Troglitazone und Ciglitazone auf die durch Leptin vermittelte Migration von HUVEC zu untersuchen und die dabei beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion näher zu charakterisieren. Da Troglitazone über seine Fähigkeit zur Aktivierung von PPAR γ hinaus auch noch α -Tocopherol-Eigenschaften besitzt und damit noch zusätzliche, von den PPARs unabhängige Wege der Signaltransduktion nutzt [92], wurde in jedem Versuchsansatz auch Ciglitazone eingesetzt, um sicherzustellen, daß die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Aktivierung von PPAR γ zurückzuführen waren.

Es zeigte sich, daß Troglitazone und Ciglitazone die Leptin-induzierte Endothelzellmigration dosisabhängig und signifikant hemmen, wobei sich Troglitazone gegenüber Ciglitazone als noch stärkerer Inhibitor erwies. Dies ist möglicherweise auf die oben erwähnte Verwandtschaft von Troglitazone mit α -Tocopherol zurückzuführen und steht in gutem Einklang mit der Tatsache, daß auch α -Tocopherol die Migration von Zellen hemmen kann, in dem untersuchten Fall allerdings von Epithelzellen [168].

An dieses Ergebnis schloß sich die Untersuchung der beteiligten Mechanismen der Signaltransduktion an. In den folgenden Western Blot-Analysen zeigte sich, daß die migrationshemmende Wirkung der Thiazolidinedione nicht auf eine Interaktion mit dem ERK1/2-Pathway zurückzuführen war. Die Inkubation der HUVEC mit Troglitazone bzw. Ciglitazone hatte auf die Aktivierung und Phosphorylierung der ERK1/2 durch Leptin keinen Einfluß. Dies führte zu der Frage, mit welchem Schritt in der Signalkette PPAR γ interferiert.

Für glatte Gefäßmuskelzellen und für Monozyten ist eine migrationshemmende Wirkung von PPAR γ bekannt, und dieser Effekt wird zumindest teilweise durch die Hemmung der Expression von die extrazelluläre Matrix degradierenden MMPs erklärt [105, 131]. Weiterführende Untersuchungen erbrachten, daß diese Hemmung der Expression von MMPs downstream der zytosolischen ERK1/2 erfolgt, da deren Aktivierung durch verschiedene Stimuli der Migration durch PPAR γ unbeeinflusst blieb [68, 105]. Dies weist auf eine transkriptionelle Regulation der MMPs durch PPAR γ hin.

Nachdem bereits gezeigt worden war, daß die Proteinkinase Akt eine Schlüsselposition in der Leptin-vermittelten Migration von Endothelzellen innehat, stellte sich die Frage, ob die Hemmung der Endothelzellmigration durch PPAR γ -Liganden auf eine Interaktion mit diesem Weg der Signaltransduktion zurückzuführen ist. Tatsächlich zeigte sich in den dazu durchgeführten Western Blots, daß die Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone die Aktivierung der Akt nach Leptin-Stimulation signifikant hemmten. Daß PPAR γ - als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor eigentlich im Nukleus anzusiedeln - eine zytosolische Kinase aktiviert, ist zunächst schwer zu erklären. In einer neueren Studie ist allerdings beschrieben, daß PPAR γ in unstimulierten Endothelzellen perinukleär und im Zytosol verteilt vorkommt und erst nach seiner Aktivierung durch verschiedene Liganden in den Nukleus transloziert [17]. So ist eine mögliche Erklärung, daß PPAR γ nach seiner Aktivierung und noch vor seiner Translokation zum Nukleus auch zytosolische Proteine wie die Proteinkinase Akt direkt beeinflußt und damit noch weitere Funktionen hat, die über seine Rolle als Transkriptionsfaktor hinausgehen.

Zusammenfassend stellen sich die Thiazolidinedione Troglitazone und Ciglitazone in dieser Arbeit als potente Inhibitoren der Endothelzellmigration dar, die mit der Proteinkinase Akt interferieren [67, 66]. Die vorliegende Arbeit liefert also weitere Mechanismen für die in zwei Arbeiten bereits beschriebene antiangiogenetische Wirkung der PPAR γ -Liganden [141, 216].

Damit eröffnet sich ein neues Feld zum therapeutischen Einsatz der antidiabetischen Thiazolidinedione, die offenbar nicht nur über die Regulation der gestörten Stoffwechselprozesse, sondern auch über einen direkten Effekt auf die Zellen des Gefäßsystems der Entwicklung diabetes-assoziiierter vaskuloproliferativer Erkrankungen vorbeugen können.

4.7 Inhibitoren der Endothelzellmigration

4.7.1 Biologische Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$

$\text{TNF}\alpha$ ist ein pleiotropes Zytokin einer Größe von 17 kDa, das vor allem von aktivierten Makrophagen gebildet wird [126, 163]. Es ist ein wichtiger immunmodulierender Faktor und spielt eine Rolle bei verschiedenen Entzündungszuständen wie der Sepsis, wo die $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel im Blut mit der Letalität korrelieren, bei Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, bei der Transplantatabstoßung und bei der körpereigenen Abwehr von Tumoren [163]. $\text{TNF}\alpha$ ist ein wichtiger regulierender Faktor im Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation [13].

Im Jahr 1975 wurde $\text{TNF}\alpha$ zum ersten Mal beschrieben und erhielt seinen Namen aufgrund seiner damals entdeckten Fähigkeit, Tumorzellen *in vitro* zu lysieren und in implantierten Tumoren im Tierversuch eine hämorrhagische Nekrose auszulösen [29]. Einige Jahre später wurde ein kataboler Faktor isoliert, der zur Entstehung der tumor- und entzündungsbedingten Cachexie beitrug und der deshalb zunächst Cachectin genannt wurde, sich dann aber als mit $\text{TNF}\alpha$ identisch erwies [15].

$\text{TNF}\alpha$ wird einer Gruppe von strukturell verwandten Zytokinen zugeordnet, der sogenannten TNF-Liganden-Familie, die insgesamt zehn Mitglieder umfaßt, darunter auch $\text{LT}\alpha$ ($\text{TNF}\beta$), $\text{LT}\beta$ und CD40L. Alle Mitglieder der TNF-Liganden-Familie kommen als Klasse-II-Membranproteine vor und wirken über direkte Zell-Zell-Kontakte. Ausnahmen davon stellen die Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ dar, die überwiegend in löslicher Form wirksam sind [126].

$\text{TNF}\alpha$ existiert in einer membrangebundenen Vorläuferform und wird durch eine spezifische Metalloprotease, dem sogenannten TACE (= $\text{TNF}\alpha$ -converting enzyme) [22], von der Zelloberfläche gelöst, wodurch es seine volle biologische Wirksamkeit erlangt [163]. Wie auch die übrigen Mitglieder dieser Liganden-Familie bildet $\text{TNF}\alpha$ Homotrimere und erhält so seine biologisch aktive Form [13].

In Entsprechung zur TNF-Liganden-Familie wurde auch eine TNF-Rezeptoren-Familie beschrieben, die neben den beiden $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren p55 und p75 noch zehn weitere Mitglieder einschließt, zum Beispiel auch CD40, den Rezeptor für den im Folgenden beschriebenen CD40L. Alle Mitglieder dieser Rezeptorenfamilie sind Klasse-I-Membranproteine, deren extrazellulärer Teil sogenannte CRD aufweist, also Sequenzen mit repetitiven Cysteinanteilen, die eine wichtige Rolle bei der Bindung der Liganden spielen [126]. Für alle Mitglieder der TNF-Liganden-Familie existiert jeweils ein einziger spezifischer Rezeptor, nicht jedoch für $\text{TNF}\alpha$, das sowohl an den p55- als auch an den p75-Rezeptor binden kann und sich diese Rezeptoren mit dem ihm eng verwandten $\text{LT}\alpha$ teilt [16].

Die Rezeptoren dieser Gruppe besitzen keine eigene Kinase-Aktivität, und so ist auch der Mechanismus der Rezeptoraktivierung noch nicht endgültig geklärt. Die in der aktuellen Literatur am häufigsten vertretene Hypothese vertritt aber die Ansicht, daß es nach der Bindung der Liganden an die jeweiligen Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie zu

einer Konformationsänderung im Rezeptor kommt, die auch als „molekularer Switch“ bezeichnet wird. Dies führt zur Assoziierung von Phosphoproteinen wie TRAF an den intrazellulären Anteil des Rezeptors, womit eine ganze Kaskade von Signalen in Gang gesetzt wird, die schließlich in der vermehrten oder reduzierten Expression bestimmter Zielgene mündet [13, 126].

Die beiden Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$, p55 und p75, sind auf nahezu allen kernhaltigen Zellen koexprimiert [211], auch auf Endothelzellen, die ein wichtiges Ziel für $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Wirkungen darstellen [155]. Wie auch bei anderen Zellen hat sich der p55-Rezeptor auf Endothelzellen als der für die Vermittlung der biologischen Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ entscheidende herausgestellt [120].

$\text{TNF}\alpha$ übt vielfältige Wirkungen auf Endothelzellen aus: So hat dieses Zytokin Einfluß auf die Form und Motilität von Endothelzellen, und es induziert die Expression verschiedener Proteine in Endothelzellen, die zum Beispiel bei der Leukozytenadhäsion und der Leukozytenaktivierung beteiligt sind. Darüber hinaus supprimiert es die Expression anderer Proteine [124].

4.7.2 $\text{TNF}\alpha$ ist kein Stimulus der Endothelzellmigration

Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße aus der bereits bestehenden Vaskulatur, ist ein Prozeß, der für die normale Entwicklung und für Reparaturvorgänge wie die Wundheilung und die Kollateralenbildung in ischämischen Geweben von entscheidender Bedeutung ist, aber auch bei pathologischen Zuständen wie dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren und bei chronischen Entzündungen eine Rolle spielt. Entzündungsreaktionen spielen sich dabei nicht nur in mikrobiell infizierten Geweben ab, sondern werden auch durch Reize wie Traumata oder Ischämie/Reperfusion hervorgerufen. In Blutgefäßen werden Entzündungsreaktionen durch verschiedene Stimuli wie oxLDL, Cholesterin, Zigarettenrauchen oder Traumata provoziert [190]. Als Folge dieser Reize wandern Entzündungszellen in diese geschädigten Gewebe ein, so auch Makrophagen, die an Orten der Angiogenese gehäuft nachgewiesen werden und die pro-angiogenetische Faktoren sezernieren [190].

Für $\text{TNF}\alpha$, das von aktivierten Makrophagen sezerniert wird, ist eine angiogenetische Wirkung beschrieben [55, 191], und in mehreren Studien wurde eine direkte Korrelation der Makrophageninfiltration und der Vaskularisation von soliden Tumoren gefunden [117, 148].

Da zur Angiogenese verschiedene Faktoren wie die Migration von Endothelzellen, die Produktion von die extrazelluläre Matrix degradierenden Metalloproteinasen und die Proliferation von Endothelzellen beitragen, stellt sich die Frage, über welche dieser einzelnen Schritte die angiogenetische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ vermittelt wird. Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Migration humaner Endothelzellen zu untersuchen.

Es ist bekannt, daß $\text{TNF}\alpha$ chemotaktisch auf verschiedene Entzündungszellen [58, 156] und auf Fibroblasten wirkt. Darüber hinaus stellt es aber auch einen chemotaktischen

Stimulus für Zellen anderen Ursprungs dar, wie die Langerhans-Zellen der Haut [104] und glatte Gefäßmuskelzellen [69]. Außerdem reguliert $\text{TNF}\alpha$ die Expression von Matrixmetalloproteasen, die die Degradation der Basalmembran bewirken und eine Voraussetzung für die Auswanderung der Endothelzellen aus ihrem Zellverband darstellen [59]. $\text{TNF}\alpha$ steigert die Sekretion von MMPs [85] und von uPA durch Endothelzellen [88].

Über die Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ auf die Endothelzellmigration liegen hingegen widersprüchliche Aussagen vor: Eine allgemein anerkannte Arbeit stellte eine direkte chemotaktische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf bovine Kapillarendothelzellen fest [119], wogegen in anderen Arbeiten kein direkter stimulatorischer Effekt auf die Endothelzellmigration gezeigt werden konnte [65].

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit unterstützen die zweite zitierte Ansicht, denn in den hier durchgeführten Migrationsversuchen konnte keine signifikante Induktion der Endothelzellmigration durch $\text{TNF}\alpha$ in einer relativ hohen Konzentration von 500 U/ml nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung bietet das Ergebnis einer weiteren Publikation, in der gezeigt wurde, daß $\text{TNF}\alpha$ zwar eine Steigerung der Endothelzellmigration bewirkt, aber nur über einen indirekten Mechanismus, nämlich durch die Induktion der Freisetzung direkter Stimuli der Migration von Endothelzellen. Die durch die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ induzierte Migration humaner Endothelzellen war in dieser Arbeit durch einen Antagonisten des PAF-Rezeptors signifikant hemmbar, was die lediglich indirekte Beteiligung von $\text{TNF}\alpha$ an der Endothelzellmigration und die Notwendigkeit der Freisetzung des direkt motogenen Faktors PAF beweist [137].

Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit der in der Literatur verbreiteten Ansicht, daß auch die angiogenetische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ nur eine indirekte ist und über die durch $\text{TNF}\alpha$ stimulierte Sekretion direkt angiogenetischer Faktoren wie bFGF [147], PAF [27] und uPA [88] aus den Endothelzellen selbst und aus benachbarten Zellen zustande kommt. Die widersprüchlichen Aussagen über die Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ auf Endothelzellen in der aktuellen Literatur wurden darüber hinaus mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärt, die beispielsweise in den jeweils eingesetzten Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$, in den Inkubationszeiten und in den untersuchten Zellarten variieren [45].

Die Stimulation der Endothelzellen mit $\text{TNF}\alpha$ über 24h hingegen erbrachte sogar eine inhibitorische Wirkung dieses Zytokins auf die Migration humaner Endothelzellen: Die darauf folgende Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ bewirkte wiederum keinen signifikanten Anstieg der Anzahl migrierter Zellen, und die mit $\text{TNF}\alpha$ behandelten Endothelzellen sprachen signifikant geringer auf eine nachfolgende VEGF-Stimulation an als die unbehandelten Zellen der Kontrolle. VEGF, das sich in den vorangegangenen Versuchen als potenter Stimulus der Endothelzellmigration erwiesen hatte, bewirkte bei den über 24h mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten Zellen nur noch eine deutlich abgeschwächte migratorische Antwort. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis findet sich in einer Arbeit von Patterson, in der er zeigt, daß $\text{TNF}\alpha$ die Expression des VEGF-Rezeptors KDR auf humanen Endothelzellen und als Konsequenz dieses Effekts auch die VEGF-induzierte Proliferation von Endothelzellen signifikant hemmt [152]. Analog dazu zeigt das Ergebnis dieser Arbeit die Hemmung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration durch $\text{TNF}\alpha$.

4.7.3 Biologische Wirkungen von CD40-CD40L

Ein weiteres Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie ist CD40, ein phosphoryliertes Glykoprotein einer Größe von 49 kDa [113]. Rezeptor-Familien wie die TNF-Rezeptor-Familie sind durch strukturelle Homologien und überlappende biologische Eigenschaften sowie gemeinsame Wege der Signaltransduktion definiert [112], und so ist auch CD40 ein Klasse I-Membranprotein ohne eigene Kinase-Aktivität. An der Transduktion der durch die Ligation von CD40 generierten Signale sind mehrere Second-Messenger-Systeme beteiligt, wie zum Beispiel verschiedene Kinasen, so auch die PI3K oder die p38- und die ERK-MAP-Kinasen [101, 157], aber auch verschiedene Mitglieder der TRAF-Familie, deren Bedeutung bei der Signaltransduktion von $\text{TNF}\alpha$ weiter oben schon erwähnt wurde [113]. Es ist bekannt, daß durch CD40 vermittelte Signale über TRAF2, TRAF3, TRAF5 und TRAF6 weiter ins Zellinnere geleitet werden [91], und daß über TRAF6 sowohl die ERK als auch der für die Umsetzung von $\text{TNF}\alpha$ -Wirkungen zentrale Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aktiviert werden [100].

CD40 wurde zunächst auf der Zellmembran von B-Lymphozyten nachgewiesen und für ein B-Zell-spezifisches Antigen gehalten [34, 153]. Inzwischen ist aber nachgewiesen worden, daß CD40 von einer Reihe weiterer Zellen exprimiert wird, zum Beispiel von dendritischen Zellen und Monozyten, aber auch von nicht-hämatopoetischen Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten [113]. Auch auf Endothelzellen ist CD40 exprimiert und funktionell aktiv [89, 217].

Der spezifische Ligand für diesen Rezeptor aus der TNF-R-Familie, CD40L, ist ein Glykoprotein, das vor allem auf aktivierten CD4^+ T-Lymphozyten exprimiert ist [77, 143]. Aber auch CD40L wurde inzwischen auf weiteren Zelltypen nachgewiesen, beispielsweise auf aktivierten Thrombozyten [87]. Wie die anderen Mitglieder der TNF-Familie wird es zunächst als Klasse II-Membranprotein einer Größe von 33 kDa gebildet und erhält seine biologisch aktive Form durch die Zusammenlagerung zu symmetrischen Homotrimeren. Es existieren aber auch lösliche, sezernierte Formen, die etwas kürzer sind (31 bzw. 18 kDa) als die membrangebundenen Proteine, aber dennoch zur Bildung von Trimeren, zur Bindung an CD40 und zur Induktion der charakteristischen Wirkungen fähig sind [78, 133].

CD40 und CD40L bilden ein Rezeptor-Liganden-System, das entscheidend an der Regulation des Immunsystems sowohl auf der Ebene der löslichen Zytokine als auch auf der der Zellkontakt-vermittelten Reaktionen beteiligt ist. So bewahrt die Bindung von CD40L humane B-Lymphozyten vor der Apoptose und induziert deren Proliferation und Reifung und - im Zusammenspiel mit anderen Entzündungsmediatoren - das sogenannte Isotyp-Switching, infolgedessen IgA-, IgG- oder IgE-Antikörper gebildet werden [113]. Ein genetischer Defekt des CD40L auf dem X-Chromsom verursacht das sogenannte HyperIgM-Syndrom, bei dem es zu einer schweren Störung der humoralen Achse des Immunsystems kommt, mit erhöhten Spiegeln von zirkulierendem IgM, während kaum Antikörper der anderen Klassen gebildet werden und B-Gedächtniszellen vollständig fehlen [144].

Auch auf Endothelzellen ist funktionelles CD40 exprimiert, und die Bindung des spezifischen Liganden CD40L induziert die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf diesen Zellen [87]. Diese Reaktion entspricht einer Aktivierung der Endothelzellen, wie sie ebenfalls durch andere Entzündungsmediatoren, zum Beispiel durch IL-1 oder durch $\text{TNF}\alpha$, hervorgerufen wird [89, 217]. Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen spielt bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion und der Extravasation von Leukozyten eine entscheidende Rolle [189]. Darüber hinaus stimuliert CD40L auch die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren wie LIF, GM-CSF und IL-6 durch Endothelzellen [38], ebenso wie die Produktion von IL-8 [123].

CD40L bewirkt die Reifung dendritischer Zellen zu muren Antigen-präsentierenden Zellen und reguliert die Sekretion von Zytokinen und Matrixmetalloproteasen durch Monozyten [113]. Darüber hinaus hat es eine antiapoptotische Wirkung auf Monozyten und verstärkt die IL-12-Sekretion durch Makrophagen, die wiederum die Reifung von TH1- Zellen induziert. Damit ist CD40L zusätzlich zu seinem entscheidenden Einfluß auf die Immunglobulin-Bildung durch B-Lymphozyten auch an der Regulation der zellulären Immunität beteiligt [189].

Zusammenfassend kann man festhalten, daß CD40L nicht nur ein entscheidender Stimulus für die Reifung von B-Zellen ist, sondern viele verschiedene immunkompetente Zellen in allen Stadien einer Entzündungsreaktion aktiviert und damit für beide Achsen der Abwehr - sowohl die humorale als auch die zelluläre - einen wichtigen Regulator darstellt.

4.7.4 CD40L ist kein Stimulus der Endothelzellmigration

Chronische Entzündungen, bei denen es zur T-Zell-Aktivierung und zur Infiltration der betroffenen Gewebe mit aktivierten T-Zellen kommt, sind häufig von der Bildung neuer Blutgefäße, also von angiogenetischen Prozessen, betroffen. Beispiele dafür stellen die Rheumatoide Arthritis [84, 149] und die Atherosklerose dar [10, 223]. Gleichzeitig exprimieren die Endothelzellen in entzündeten Geweben verstärkt CD40, was für Erkrankungen der Haut, wie etwa die Kontaktallergie und die Psoriasis, ebenso wie für atherosklerotische Plaques nachgewiesen wurde [89, 122].

Dies führt zur Annahme einer direkten Assoziation zwischen der Anwesenheit von CD40L auf der Zellmembran aktivierter T-Lymphozyten sowie seines Rezeptors CD40 auf den Endothelzellen und der angiogenetischen Vorgänge in Entzündungsgebieten [139]. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, daß CD40L die Endothelzellen nicht nur zu Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 stimulieren kann, sondern auch zur Bildung direkter Promotoren der Angiogenese, wie VEGF. In derselben Arbeit wurde auch eine direkte angiogenetische Wirkung von CD40L in vivo nachgewiesen [135]. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche angiogenetische Wirkung von CD40L ist die Entdeckung, daß aktivierte T-Lymphozyten über einen CD40L-abhängigen Mechanismus die Sekretion von die extrazelluläre Matrix degradierenden Matrixmetalloproteasen durch Endothelzellen hochregulieren. Darüber hinaus bewirkte die Stimulation der Endothelzellen mit CD40L die Bildung von Blutgefäß-Äquivalen-

ten im 3-D-Matrigel-Modell, was ein weiteres wichtiges Indiz für eine angiogenetische Wirkung dieses Zytokins darstellt [121].

Da die Migration von Endothelzellen einen wichtigen Schritt im komplexen Vorgang der Angiogenese, also der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehender Vaskulatur, darstellt, war ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluß von CD40L auf die Migration humaner Endothelzellen zu untersuchen. Hinweise auf eine mögliche migrationssteigernde Wirkung von CD40L ergaben sich aus Arbeiten, in denen die direkte angiogenetische Wirkung von CD40L gezeigt wurde, und insbesondere aus der bereits zitierten Publikation von Mach, in der er die gesteigerte Sekretion von Matrixmetalloproteasen nach Stimulation von kultivierten Endothelzellen mit CD40L nachweist [121]. Die Expression und Sekretion von Metalloproteasen ist eine wichtige Voraussetzung für die Endothelzellmigration, da diese Zellen sich zunächst aus ihrem festen Zellverband lösen müssen.

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf eine mögliche Induktion der Endothelzellmigration durch deren Stimulation mit CD40L gab eine Publikation, in der nachgewiesen wurde, daß CD40L in einer humanen Zelllinie die ERK MAP-Kinase aktivierte. Diese Proteinkinase hatte sich bei den vorangegangenen Versuchen der hier vorgelegten Arbeit als Schlüsselenzym der Migration erwiesen, und alle untersuchten Promotoren der Endothelzellmigration bewirkten eine signifikante Aktivierung der ERK. Auch in der Literatur wird eine Beteiligung der ERK MAP-Kinase an der Migration von Zellen diskutiert [31, 33, 68, 195].

Zur Untersuchung der Effekte von CD40L auf die Endothelzellmigration wurde in der hier vorgelegten Arbeit derselbe Ansatz gewählt, wie er auch für $\text{TNF}\alpha$ angewandt worden war. Die Ergebnisse erbrachten keinen Hinweis auf eine promigratorische Wirkung von CD40L auf die untersuchten humanen umbilikalen Endothelzellen, sondern im Gegenteil eine signifikante Hemmung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration bei der mit CD40L vorbehandelten Gruppe gegenüber der Kontrolle. Auch gegenüber der VEGF-induzierten Migration der mit nicht transfizierten P3xWT-Zellen vorbehandelten Endothelzellen bewirkte CD40L eine signifikante Hemmung. Als dritte Kontrolle waren Endothelzellen untersucht worden, die zwar über 24h mit den CD40L-positiven P3xTBA7-Zellen inkubiert worden waren, denen aber zusätzlich TRAP-1 zugesetzt worden war, ein löslicher Antikörper für CD40 [77, 78]. Bei dieser dritten Gruppe von HUVEC war zwar auch eine Hemmung der VEGF-induzierten Migration zu beobachten, die allerdings gegenüber der Kontrolle nicht signifikant war und auch nicht so deutlich ausfiel wie die Hemmung in der Gruppe der mit CD40L-positiven P3xTBA7-inkubierten Endothelzellen. Eine mögliche Erklärung dafür findet sich in der Annahme, daß nicht alle Bindungsstellen für CD40L auf den HUVEC durch TRAP-1 besetzt waren, so daß die zugesetzten P3xTBA7-Zellen trotz Anwesenheit eines verdrängenden Antikörpers ihre migrationshemmende Wirkung auf die HUVEC entfalten konnten. Zusammenfassend zeigte CD40L in den hier vorgestellten Untersuchungen keine migrationssteigernde Wirkung auf humane Endothelzellen, und in Analogie zu den mit $\text{TNF}\alpha$ gefundenen Ergebnissen hemmte es signifikant die VEGF-induzierte Endothelzellmigration.

Dies steht in guter Übereinstimmung mit der in verschiedenen Publikationen beschriebenen Tatsache, daß CD40L und $\text{TNF}\alpha$ sich überlappende Wege der Signaltransduktion

benutzen, wie etwa die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [100, 99]. Dies und die Zugehörigkeit von CD40L und TNF α zur gleichen Zytokin-Familie läßt auch den Schluß auf ähnliche biologische Wirkungen zu, wie sie hier in Bezug auf die Endothelzellmigration gefunden wurden. Darüber hinaus ist zwar die Aktivierung der ERK MAP-Kinase durch CD40L beschrieben worden [100], ein Schlüsselsignal für die Migration vaskulärer und nicht-vaskulärer Zellen, aber einerseits werden in der zitierten Publikation keine Aussagen über die Kinetik dieser Aktivierung getroffen. Und zweitens lag das Aktivitätsmaximum der Phospho-ERK-MAPK bei den in der hier vorgelegten Arbeit gefundenen Ergebnissen regelmäßig ca. 10 min. nach Beginn der Stimulation durch verschiedene Zytokine wie VEGF und Leptin. Der mit den CD40L-positiven Zellen untersuchte Stimulationszeitraum betrug hingegen 24h, so daß auch dies eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer migrationssteigernden Wirkung dieses Zytokins darstellt. Ein weiterer möglicher Störfaktor besteht in der Tatsache, daß kultivierte Endothelzellen - im Gegensatz zu Endothelzellen in gesundem Gewebe in vivo - den CD40L selbst auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [123]. Man muß also in Betracht ziehen, daß auto- und parakrine Wirkungen von CD40L das Ergebnis der externen Stimulation mit P3xTBA7-Zellen verfälschen können.

Diese Ergebnisse stellen einen ersten Schritt in der Untersuchung der Wirkungen von CD40L auf die Endothelzellmigration dar, und zur umfassenden Analyse dieser Wirkungen werden noch weitere Untersuchungen erforderlich sein. Ein interessanter Ansatz wäre zum Beispiel die Untersuchung kurzfristiger Effekte von CD40L auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen und die Erstellung der Kinetik einer etwaigen ERK-MAPK-Aktivierung durch CD40L. Die Analyse der Expression der VEGF-Rezeptoren KDR und flt-1 auf den Endothelzellen vor und nach deren Stimulation mit CD40L könnte zur Erklärung der beobachteten Hemmung der VEGF-induzierten Endothelzellmigration durch CD40L beitragen, wenn beispielsweise eine negative Regulation dieser Rezeptoren gefunden würde.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Einflüsse verschiedener Zytokine auf die Migration humaner Endothelzellen und in der näheren Charakterisierung daran beteiligter Mechanismen der Signaltransduktion. Dazu wurden zunächst ein auf einer modifizierten Boyden-Kammer aufbauender Migrationsassay für HUVEC etabliert und ein interner Standard geschaffen. Der Einfluß der einzelnen Wachstumsfaktoren im Kulturmedium auf die Migration wurde analysiert, und dabei stellten sich sowohl FCS als auch a-FGF als potente Stimuli der Endothelzellmigration heraus. Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde ein 5% FCS enthaltendes Versuchsmedium festgelegt.

Auf den so definierten Versuchsbedingungen aufbauend wurden die Einflüsse der Zytokine VEGF und Leptin auf die Endothelzellmigration untersucht. Es stellte sich heraus, daß beide starke Induktoren der Endothelzellmigration sind. Die ERK-MAP-Kinase stellte sich in beiden Fällen als ein Schlüsselmechanismus der migratorischen Antwort von HUVEC dar, dessen Blockade eine starke Inhibition der durch die jeweiligen Zytokine induzierten Migration bewirkte.

Außerdem wurde der Einfluß der antidiabetischen Thiazolidinedione auf die Leptin-stimulierte Endothelzellmigration analysiert. Die Thiazolidinedione hemmten signifikant die Migration der HUVEC nach Stimulation mit Leptin. Die sich anschließenden Western Blots zeigten, daß diese Hemmung auf einer negativen Wirkung der Thiazolidinedione auf die Aktivierung und Phosphorylierung einer weiteren Kinase beruhte, der zytosolischen Proteinkinase Akt. Damit wird in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, daß an der Leptin-stimulierten Migration von Endothelzellen zwei voneinander unabhängiger Wege der Signaltransduktion beteiligt sind, nämlich die ERK-MAPK und die zytosolische Kinase Akt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden zwei Zytokine aus der Gruppe der TNF-Liganden-Familie untersucht. Für $\text{TNF}\alpha$ ergab sich kein Einfluß auf die Endothelzellmigration bei einer kurzfristigen Stimulation einer Dauer von 5h, jedoch eine signifikante Hemmung der VEGF-induzierten Migration nach 24h-Stimulation. Auch die Inkubation der HUVEC mit CD40L exprimierenden T3xTBA7-Zellen über 24h hemmte deren migratorische Antwort auf Stimulation mit dem potenten endothelzellspezifischen Chemokin VEGF signifikant.

Damit wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, daß Antidiabetika aus der Gruppe der $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden eine direkte hemmende Wirkung auf die Endothelzellmigration haben, und daß diese Inhibition über eine Interferenz mit der Proteinkinase Akt zustande kommt. Dies weist auf die Möglichkeit hin, daß der therapeutische Ein-

satz dieser Substanzklasse zusätzlich zur Regulation der Stoffwechselprozesse direkte Wirkungen auf das Blutgefäßsystem von Patienten mit NIDDM haben und sekundäre Symptome wie die diabetische Retinopathie eindämmen kann. Diese Perspektive wird jedoch in Versuchen am lebenden Organismus verifiziert werden müssen.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus zum ersten Mal der Einfluß des proinflammatorischen Zytokins CD40L auf die Endothelzellmigration mit Hilfe der modifizierten Boyden-Kammer untersucht. In Übereinstimmung mit den für $\text{TNF}\alpha$ gefundenen Ergebnissen hemmte die Inkubation der HUVEC über 24h mit CD40L deren VEGF-stimulierte Migration signifikant. Auch zur Erklärung dieser Ergebnisse werden weitere Untersuchungen erforderlich sein, so zum Beispiel die Analyse der Einflüsse von CD40L auf die Expression des VEGF-Rezeptors auf Endothelzellen oder die Untersuchung der Auswirkungen einer kurzzeitigen Stimulation mit CD40L auf die Endothelzellmigration.

Literaturverzeichnis

- [1] ABEDI, H. und I. ZACHARY: *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells.* J. Biol. Chem., 272:15442–15451, 1997.
- [2] AGATA, J., A. MASUDA und M. TAKADA: *High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension.* Hypertension, 10:1171–1174, 1997.
- [3] AHIMA, R. S. und J. S. FLIER: *Leptin.* Annu. Rev. Physiol, 62:413–437, 2000.
- [4] ALESSI, D. R., A. CUENDA und P. COHEN: *PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo.* J. Biol. Chem., 17:27489–94, 1995.
- [5] APLIN, A. E., HOWE, S. K. ALAHARI und R. L. JULIANO: *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.* Pharm Rev, 50:197–263, 1998.
- [6] ATTOUB, S., V. NOE, L. PIROLA, E. BRUYNEEL, E. CHASTRE, M. MAREEL, M. P. WYMAN und C. GESPACH: *Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways.* FASEB J., 14(14):2329–2338, 2000.
- [7] AUBOEUF, D., J. RIEUSSET, L. FAJAS, P. VALLIER, V. FRERING, J. P. RIOU, B. STAELS, J. AUWERX, M. LAVILLE und H. VIDAL: *Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients.* Diabetes, 46(8):1319–1327, 1997.
- [8] BACHETTI, T. und L. MORBIDELLI: *Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions.* Pharmacol. Res., 42(1):9–19, 2000.
- [9] BANKS, W. A., A. J. KASTIN, W. HUANG, J. B. JASPAN und L. M. MANESS: *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin.* Peptides, 17(2):305–311, 1996.
- [10] BARGER, A. C., III R. BEEUWKES, L. L. LAINEY und K. J. SILVERMAN: *Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis.* N. Engl. J Med., 310(3):175–177, 1984.

- [11] BARLEON, B., G. SIEMEISTER, G. MARTINY-BARON, K. WEINDEL, C. HERZOG und D. MARME: *Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells.* Cancer Res., 57(23):5421–5425, 1997.
- [12] BAUMANN, H., K. K. MORELLA, D. W. WHITE, M. DEMBSKI, P. S. BAILON, H. KIM, C. F. LAI und L. A. TARTAGLIA: *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93(16):8374–8378, 1996.
- [13] BAZZONI, F. und B. BEUTLER: *The tumor necrosis factor ligand and receptor families.* N. Engl. J. Med., 334(26):1717–1725, 1996.
- [14] BELLAHCŠNE, A.: *Bone Sialoprotein mediates human Endothelial Cell Attachment and Migration and promotes Angiogenesis.* Circ Res, 86:885–891, 2000.
- [15] BEUTLER, B., D. GREENWALD, J. D. HULMES, M. CHANG, Y. C. PAN, J. MATHISON, R. ULEVITCH und A. CERAMI: *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.* Nature, 316(6028):552–554, 1985.
- [16] BEUTLER, B. und C. VAN HUFFEL: *Unraveling function in the TNF ligand and receptor families.* Science, 264(5159):667–668, 1994.
- [17] BISHOP-BAILEY, D.: *Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system.* Br. J. Pharmacol., 129(5):823–834, 2000.
- [18] BISHOP-BAILEY, D. und T. HLA: *Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator- activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2.* J. Biol. Chem., 274(24):17042–17048, 1999.
- [19] BJORBAEK, C., K. EL HASCHIMI, J. D. FRANTZ und J. S. FLIER: *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance.* J. Biol. Chem., 274(42):30059–30065, 1999.
- [20] BJORBAEK, C., S. UOTANI, B. DA SILVA und J. S. FLIER: *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor.* J. Biol. Chem., 272(51):32686–32695, 1997.
- [21] BLABER, M., J. DISALVO und K. A. THOMAS: *X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor.* Biochemistry, 35(7):2086–2094, 1996.
- [22] BLACK, R. A., C. T. RAUCH, C. J. KOZLOSKY, J. J. PESCHON, J. L. SLACK, M. F. WOLFSON, B. J. CASTNER, K. L. STOCKING, P. REDDY, S. SRINIVASAN, N. NELSON, N. BOIANI, K. A. SCHOOLEY, M. GERHART, R. DAVIS, J. N. FITZNER, R. S. JOHNSON, R. J. PAXTON, C. J. MARCH und D. P. CERRETTI: *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells.* Nature, 385(6618):729–733, 1997.
- [23] BODEN, G., X. CHEN, M. MOZZOLI und I. RYAN: *Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects.* J. Clin. Endocrinol. Metab, 81(9):3419–3423, 1996.

- [24] BOULOUMIE, A., H. C. DREXLER, M. LAFONTAN und R. BUSSE: *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ. Res., 83(10):1059–1066, 1998.
- [25] BOULOUMIE, A., T. MARUMO, M. LAFONTAN und R. BUSSE: *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. FASEB J., 13(10):1231–1238, 1999.
- [26] BOYDEN, S.: *The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes*. Generic, 1961.
- [27] BUSSOLINO, F., G. CAMUSSI und C. BAGLIONI: *Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha*. J. Biol. Chem., 263(24):11856–11861, 1988.
- [28] CARMELIET, P.: *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat. Med., 6(4):389–395, 2000.
- [29] CARSWELL, E. A., L. J. OLD, R. L. KASSEL, S. GREEN, N. FIORE und B. WILLIAMSON: *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 72(9):3666–3670, 1975.
- [30] CHEN, Z., R. J. FISHER, C. W. RIGGS, J. S. RHIM und J. A. LAUTENBERGER: *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides*. Cancer Res., 57(10):2013–2019, 1997.
- [31] CHERESH, D. A., J. LENG und R. L. KLEMKE: *Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells*. J. Cell Biol., 146(5):1107–1116, 1999.
- [32] CHO, A., J. GRAVES und M. A. REIDY: *Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20(12):2527–2532, 2000.
- [33] CHO, S. Y. und R. L. KLEMKE: *Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix*. J. Cell Biol., 149(1):223–236, 2000.
- [34] CLARK, E. A. und J. A. LEDBETTER: *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 83(12):4494–4498, 1986.
- [35] CLAUSS, M., H. WEICH, G. BREIER, U. KNIES, W. ROCKL, J. WALTENBERGER und W. RISAU: *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis*. J. Biol. Chem., 271(30):17629–17634, 1996.
- [36] CORTON, J. C., S. P. ANDERSON und A. STAUBER: *Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators*. Annu Rev Pharmacol. Toxicol., 40:491–518, 2000.
- [37] DAVIS, G. E. und C. W. CAMARILLO: *An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence re-*

- gulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix.* Exp Cell Res, 224(1):39–51, 1996.
- [38] DECHANET, J., C. GROSSET, J. L. TAUPIN, P. MERVILLE, J. BANCHEREAU, J. RIPOCHE und J. F. MOREAU: *CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells.* J Immunol., 159(11):5640–5647, 1997.
 - [39] DIMMELER, S., E. DERNBACH und A. M. ZEIHNER: *Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration.* FEBS Lett., 477(3):258–262, 2000.
 - [40] DIMMELER, S. und A. M. ZEIHNER: *Akt takes center stage in angiogenesis signaling.* Circ. Res., 86(1):4–5, 2000.
 - [41] DREYER, C., G. KREY, H. KELLER, F. GIVEL, G. HELFTENBEIN und W. WAHLI: *Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors.* Cell, 68(5):879–887, 1992.
 - [42] DUDLEY, D. T., L. PANG und S. J. DECKER: *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7686–7689, 1995.
 - [43] ELMQUIST, J. K., R. S. AHIMA, C. F. ELIAS, J. S. FLIER und C. B. SAPER: *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 95(2):741–746, 1998.
 - [44] ERICSSON, C. G., J. NILSSON, L. GRIP, B. SVANE und A. HAMSTEN: *Effect of bezafibrate treatment over five years on coronary plaques causing 20Beza-fibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial [BECAIT]).* Am. J. Cardiol., 80(9):1125–1129, 1997.
 - [45] FAJARO, L. F., H. H. KWAN und J. KOWALSKI: *Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis.* Am J Pathol, 140:539, 1992.
 - [46] FANTUZZI, G. und R. FAGGIONI: *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis.* J. Leukoc. Biol., 68(4):437–446, 2000.
 - [47] FERRARA, N.: *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.* J. Mol. Med., 77(7):527–543, 1999.
 - [48] FERRARA, N. und W. J. HENZEL: *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 161(2):851–858, 1989.
 - [49] FLIER, J. S.: *Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role.* J. Clin. Endocrinol. Metab, 83(5):1407–1413, 1998.
 - [50] FOLKMAN, J. und C. HAUDENSCHILD: *Angiogenesis in vitro.* Nature, 288(5791):551–556, 1980.
 - [51] FOLKMAN, J. und M. KLAGSBRUN: *Angiogenic factors.* Science, 235(4787):442–447, 1987.

- [52] FOLKMAN, J. und M. KLAGSBRUN: *Vascular physiology. A family of angiogenic peptides*. Nature, 329(6141):671–672, 1987.
- [53] FONG, G. H., J. ROSSANT, M. GERTSENSTEIN und M. L. BREITMAN: *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 376(6535):66–70, 1995.
- [54] FRANK, S., B. STALLMEYER, H. KAMPFER, N. KOLB und J. PFEILSCHIFTER: *Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair*. J. Clin. Invest, 106(4):501–509, 2000.
- [55] FRATER-SCHRODER, M., W. RISAU, R. HALLMANN, P. GAUTSCHI und P. BOHLEN: *Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo*. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 84(15):5277–5281, 1987.
- [56] FRIEDLANDER, M., P. C. BROOKS und R. W. SHAFFER: *Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins*. Science, 270:1500–1502, 1995.
- [57] FRIESEL, R. E. und T. MACIAG: *Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction*. FASEB J., 9(10):919–925, 1995.
- [58] FURIE, M. B. und D. D. MCHUGH: *Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- alpha*. J. Immunol., 143(10):3309–3317, 1989.
- [59] GALIS, Z. S., M. MUSZYNSKI und G. K. SUKHOVA: *Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 748:501–507, 1995.
- [60] GARFINKEL, S., X. HU, I. A. PRUDOVSKY, G. A. MCMAHON, E. M. KAPNIK, S. D. MCDOWELL und T. MACIAG: *FGF-1-dependent proliferative and migratory responses are impaired in senescent human umbilical vein endothelial cells and correlate with the inability to signal tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 substrates*. J. Cell Biol., 134(3):783–791, 1996.
- [61] GERBER, H. P., V. DIXIT und N. FERRARA: *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. J. Biol. Chem., 273(21):13313–13316, 1998.
- [62] GERBER, H. P., A. MCMURTREY, J. KOWALSKI, M. YAN, B. A. KEYT, V. DIXIT und N. FERRARA: *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J. Biol. Chem., 273(46):30336–30343, 1998.
- [63] GHILARDI, N., S. ZIEGLER, A. WIESTNER, R. STOFFEL, M. H. HEIM und R. C. SKODA: *Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 93(13):6231–6235, 1996.

- [64] GILLE, H., M. KORTENJANN, O. THOMAE, C. MOOMAW, C. SLAUGHTER, M. H. COBB und P. E. SHAW: *ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation*. EMBO J., 14(5):951–962, 1995.
- [65] GIRAUDO, E., L. PRIMO, E. AUDERO, H. P. GERBER, P. KOOLWIJK, S. SOKER, M. KLAGSBRUN, N. FERRARA und F. BUSSOLINO: *Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin- 1 in human vascular endothelial cells*. J. Biol. Chem., 273(34):22128–22135, 1998.
- [66] GOETZE, S., A. BUNGENSTOCK und C. CZUPALLA: *Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPAR γ -ligands*. Hypertension, 40, 2002.
- [67] GOETZE, S., F. EILERS und A. BUNGENSTOCK: *PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 293:1431–1437, 2002.
- [68] GOETZE, S., X. P. XI, H. KAWANO, T. GOTLIBOWSKI, E. FLECK, W. A. HSUEH und R. E. LAW: *PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells*. J. Cardiovasc. Pharmacol., 33(5):798–806, 1999.
- [69] GOETZE, S., X. P. XI, Y. KAWANO, H. KAWANO, E. FLECK, W. A. HSUEH und R. E. LAW: *TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent*. Hypertension, 33(1 Pt 2):183–189, 1999.
- [70] GOLIGORSKY, M. S., H. ABEDI, E. NOIRI, A. TAKHTAJAN, S. LENSE, V. ROMANOV und I. ZACHARY: *Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells*. Am. J. Physiol, 276(6 Pt 1):C1271–C1281, 1999.
- [71] GONZALEZ, F. A., A. SETH, D. L. RADEN, D. S. BOWMAN, F. S. FAY und R. J. DAVIS: *Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus*. J. Cell Biol., 122(5):1089–1101, 1993.
- [72] GOSPODAROWICZ, D., J. A. ABRAHAM und J. SCHILLING: *Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells*. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 86(19):7311–7315, 1989.
- [73] GOSPODAROWICZ, D., N. FERRARA, N. SCHWEIGERER und G. NEUFELD: *Structural characterization and biologic functions of fibroblast growth factor*. Endocrine Rev, 8:95–114, 1987.
- [74] GOTLIEB, A. I. und W. SPECTOR: *Migration into an in vitro experimental wound: a comparison of porcine aortic endothelial and smooth muscle cells and the effect of culture irradiation*. Am. J. Pathol., 103(2):271–282, 1981.
- [75] GOTLIEB, A. I., W. SPECTOR, M. K. K. WONG und C. LACEY: *In Vitro Reendothelialization*. Arteriosclerosis, 4:91–96, 1984.

- [76] GÖTTLICHER, M.: *Fatty Acids activate a chimera of the Clofibrilic Acid-Activated Receptors and the Glucocorticoid Receptor*. PNAS, 89:4653–4657, 1992.
- [77] GRAF, D., U. KORTHAUER, H. W. MAGES, G. SENGER und R. A. KROCZEK: *Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells*. Eur. J. Immunol., 22(12):3191–3194, 1992.
- [78] GRAF, D., S. MULLER, U. KORTHAUER, C. VAN KOOTEN, C. WEISE und R. A. KROCZEK: *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. Eur. J Immunol., 25(6):1749–1754, 1995.
- [79] GRÄFE, M., W. AUCH-SCHWELK und K. GRAF: *Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts*. Am. J. Physiol., 267:H2138–H2148, 1994.
- [80] GRÄFE, M., K. GRAF, W. AUCH-SCHWELK, D. TERBEEK, H. HERTEL und E. FLECK: *Cultivation and characterization of micro-and macrovascular endothelial cells from the human heart*. Eur. Heart J., 14 (Suppl. I):74–81, 1993.
- [81] GRANT, D. S., J. L. KINSELLA, M. C. KIBBEY, S. LAFLAMME, P. D. BURBELLO, A. L. GOLDSTEIN und H. K. KLEINMAN: *Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells*. J. Cell Sci., 108 (Pt 12):3685–3694, 1995.
- [82] GUO, D., Q. JIA, H. Y. SONG, R. S. WARREN und D. B. DONNER: *Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation*. J. Biol. Chem., 270(12):6729–6733, 1995.
- [83] HALAAS, J. L., K. S. GAJIWALA, M. MAFFEI, S. L. COHEN, B. T. CHAIT, D. RABINOWITZ, R. L. LALLONE, S. K. BURLEY und J. M. FRIEDMAN: *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science, 269(5223):543–546, 1995.
- [84] HALE, H. P., M. E. MARTIN und D. E. MCCOLLUM: *Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment*. Arthritis Rheum, 32:22–30, 1989.
- [85] HANEMAAIJER, R., P. KOOLWIJK, L. LE CLERCQ, W. J. DE VREE und V. W. VAN HINSBERGH: *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester*. Biochem. J., 296 (Pt 3):803–809, 1993.
- [86] HAYNES, W. G., W. I. SIVITZ, D. A. MORGAN, S. A. WALSH und A. L. MARK: *Sympathetic and cardiorenal actions of leptin*. Hypertension, 30(3 Pt 2):619–623, 1997.
- [87] HENN, V., J. R. SLUPSKY, M. GRAFE, I. ANAGNOSTOPOULOS, R. FORSTER, G. MULLER-BERGHHAUS und R. A. KROCZEK: *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 391(6667):591–594, 1998.

- [88] HINSBERGH, V. W. VAN, E. A. VAN DEN BERG und W. FIERS: *Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells*. Blood, 75:1991–1998, 1990.
- [89] HOLLENBAUGH, D., N. MISCHÉL-PETTY, C. P. EDWARDS, J. C. SIMON, R. W. DENFELD, P. A. KIENER und A. ARUFFO: *Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells*. J Exp Med., 182(1):33–40, 1995.
- [90] HORIKOSHI, H.: *Troglitazone (CS-045), a new antidiabetic drug*. Annu Rep Sankyo Res Lab, 46:1–57, 1994.
- [91] HU, H. M., K. O’ROURKE, M. S. BOGUSKI und V. M. DIXIT: *A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40*. J Biol. Chem., 269(48):30069–30072, 1994.
- [92] INOUE, I., S. KATAYAMA, K. TAKAHASHI, K. NEGISHI, T. MIYAZAKI, M. SONODA und T. KOMODA: *Troglitazone has a scavenging effect on reactive oxygen species*. Biochem. Biophys. Res Commun., 235(1):113–116, 1997.
- [93] INOUE, I., K. TAKAHASHI, S. KATAYAMA, S. AKABANE, K. NEGISHI, M. SUZUKI, J. ISHII und S. KAWAZU: *Improvement of glucose tolerance by bezafibrate in non-obese patients with hyperlipidemia and impaired glucose tolerance*. Diabetes Res Clin Pract., 25(3):199–205, 1994.
- [94] ISSEMAN, L. und S. GREEN: *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*. Nature, 347:645–650, 1999.
- [95] IWASAKA, C., K. TANAKA, M. ABE und Y. SATO: *Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells*. J. Cell Physiol, 169(3):522–531, 1996.
- [96] JAFFE, E. A., R. L. NACHMAN, C. G. BECKER und C. R. MINICK: *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J. Clin. Invest, 52(11):2745–2756, 1973.
- [97] JAFFE, E. A. und R. ROSS: *Synthesis of von Willebrandt Factor by Endothelial Cells*. In: PRESS, C. R. C. (Herausgeber): *Endothelial Cells*, Seiten 119–126. 1988.
- [98] KANNO, S., N. ODA, M. ABE, Y. TERA, M. ITO, K. SHITARA, K. TABAYASHI, M. SHIBUYA und Y. SATO: *Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells*. Oncogene, 19(17):2138–2146, 2000.
- [99] KARMANN, K., W. MIN, W. C. FANSLOW und J. S. POBER: *Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1*. J Exp Med., 184(1):173–182, 1996.
- [100] KASHIWADA, M., Y. SHIRAKATA, J. I. INOUE, H. NAKANO, K. OKAZAKI, K. OKUMURA, T. YAMAMOTO, H. NAGAOKA und T. TAKEMORI: *Tumor ne-*

- crosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway.* J Exp Med., 187(2):237–244, 1998.
- [101] KEHRY, M. R.: *CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death.* J Immunol., 156(7):2345–2348, 1996.
 - [102] KERSTEN, S., B. DESVERGNE und W. WAHLI: *Roles of PPARs in health and disease.* Nature, 405(6785):421–424, 2000.
 - [103] KIESER, A., H. A. WEICH, G. BRANDNER, D. MARME und W. KOLCH: *Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression.* Oncogene, 9(3):963–969, 1994.
 - [104] KIMBER, I. und M. CUMBERBATCH: *Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha).* J. Invest Dermatol., 99(5):48S–50S, 1992.
 - [105] KINTSCHER, U., S. GOETZE, S. WAKINO, S. KIM, S. NAGPAL, R. A. CHANDRARATNA, K. GRAF, E. FLECK, W. A. HSUEH und R. E. LAW: *Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes.* Eur. J. Pharmacol., 401(3):259–270, 2000.
 - [106] KLEINMAN, H. K., M. L. MCGARVEY, L. A. LIOTTA, P. G. ROBEY, K. TRYGGVASON und G. R. MARTIN: *Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma.* Biochemistry, 21(24):6188–6193, 1982.
 - [107] KLEMKE, R. L., S. CAI, A. L. GIANNINI, P. J. GALLAGHER, P. DE LANEROLLE und D. A. CHERESH: *Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase.* J. Cell Biol., 137(2):481–492, 1997.
 - [108] KLIEWER, S. A., J. M. LENHARD, T. M. WILLSON, I. PATEL, D. C. MORRIS und J. M. LEHMANN: *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation.* Cell, 83(5):813–819, 1995.
 - [109] KLIEWER, S. A., K. UMESONO, D. J. NOONAN, R. A. HEYMAN und R. M. EVANS: *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.* Nature, 358(6389):771–774, 1992.
 - [110] KLIEWER, S. A. und T. M. WILLSON: *The nuclear receptor PPARgamma - bigger than fat.* Curr Opin Genet Dev, 5:576–581, 1998.
 - [111] KONTOS, C. D. und B. H. ANNEX: *Angiogenesis.* Curr. Atheroscler. Rep., 1(2):165–171, 1999.
 - [112] KOOTEN, C. VAN und J. BANCHEREAU: *Functional role of CD40 and its ligand.* Int. Arch Allergy Immunol., 113(4):393–399, 1997.

- [113] KOOTEN, C. VAN und J. BANCHEREAU: *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc. Biol., 67(1):2–17, 2000.
- [114] KROLL, J. und J. WALTENBERGER: *The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells*. J. Biol. Chem., 272(51):32521–32527, 1997.
- [115] LAMOREAUX, W. J., M. E. FITZGERALD, A. REINER, K. A. HASTY und S. T. CHARLES: *Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro*. Microvasc. Res., 55(1):29–42, 1998.
- [116] LAW, R. E., W. P. MEEHAN, X. P. XI, K. GRAF, D. A. WUTHRICH, W. COATS, D. FAXON und W. A. HSUEH: *Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia*. J. Clin. Invest, 98(8):1897–1905, 1996.
- [117] LEEK, R. D., C. E. LEWIS, R. WHITEHOUSE, M. GREENALL, J. CLARKE und A. L. HARRIS: *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res, 56(20):4625–4629, 1996.
- [118] LEHMANN, J. M., L. B. MOORE, T. A. SMITH-OLIVER, W. O. WILKISON, T. M. WILLSON und S. A. KIEWER: *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J. Biol. Chem., 270(22):12953–12956, 1995.
- [119] LEIBOVICH, S. J., P. J. POLVERINI, H. M. SHEPARD, D. M. WISEMAN, V. SHIVELY und N. NUSEIR: *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- alpha*. Nature, 329(6140):630–632, 1987.
- [120] LOETSCHER, H., D. STUEBER, D. BANNER, F. MACKAY und W. LESSLAUER: *Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors*. J. Biol. Chem., 268(35):26350–26357, 1993.
- [121] MACH, F., U. SCHONBECK, R. P. FABUNMI, C. MURPHY, E. ATKINSON, J. Y. BONNEFOY, P. GRABER und P. LIBBY: *T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation*. Am J Pathol, 154(1):229–238, 1999.
- [122] MACH, F., U. SCHONBECK und P. LIBBY: *CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis?* Atherosclerosis, 137 Suppl:89–95, 1998.
- [123] MACH, F., U. SCHONBECK, G. K. SUKHOVA, T. BOURCIER, J. Y. BONNEFOY, J. S. POBER und P. LIBBY: *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 94(5):1931–1936, 1997.
- [124] MADGE, L. A. und J. S. POBER: *TNF signaling in vascular endothelial cells*. Exp Mol. Pathol., 70(3):317–325, 2001.

- [125] MAFFEI, M., J. HALAAS, E. RAVUSSIN, R. E. PRATLEY, G. H. LEE, Y. ZHANG, H. FEI, S. KIM, R. LALLONE, S. RANGANATHAN und .: *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. Nat. Med., 1(11):1155–1161, 1995.
- [126] MALEK, N. P., S. PLUEMPE und S. KUBICKA: *Molecular Mechanisms of TNF Receptor-Mediated Signaling*. Recent Results in Cancer Research, 147:97–106, 1998.
- [127] MALINDA, K. M., A. L. GOLDSTEIN und H. K. KLEINMAN: *Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells*. FASEB J., 11(6):474–481, 1997.
- [128] MANGELSDORF, D. J. und R. M. EVANS: *The RXR Heterodimers and Orphan Receptors*. Cell, 83:841–850, 1995.
- [129] MARUYAMA, Y.: *The Human Endothelial Cell in Tissue Culture*. Generic, 1963.
- [130] MARX, N., T. BOURCIER, G. K. SUKHOVA, P. LIBBY und J. PLUTZKY: *PPAR-gamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19(3):546–551, 1999.
- [131] MARX, N., U. SCHONBECK, M. A. LAZAR, P. LIBBY und J. PLUTZKY: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells*. Circ. Res., 83(11):1097–1103, 1998.
- [132] MARX, N., G. SUKHOVA, C. MURPHY, P. LIBBY und J. PLUTZKY: *Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro*. Am. J. Pathol., 153(1):17–23, 1998.
- [133] MAZZEI, G. J., M. D. EDGERTON, C. LOSBERGER, S. LECOANET-HENCHOZ, P. GRABER, A. DURANDY, J. F. GAUCHAT, A. BERNARD, B. ALLET und J. Y. BONNEFOY: *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol. Chem., 270(13):7025–7028, 1995.
- [134] MEILI, R., C. ELLSWORTH, S. LEE, T. B. REDDY, H. MA und R. A. FIRTEL: *Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium*. EMBO J., 18(8):2092–2105, 1999.
- [135] MELTER, M., M. E. REINDERS, M. SHO, S. PAL, C. GEEHAN, M. D. DENTON, D. MUKHOPADHYAY und D. M. BRISCOE: *Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo*. Blood, 96(12):3801–3808, 2000.
- [136] MONTESANO, R., J. D. VASSALLI und A. BAIRD: *Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7297–7301, 1986.

- [137] MONTRUCCHIO, G., E. LUPAIA und A. DE MARTINO: *Nitric Oxide Mediates Angiogenesis Induced in Vivo by Platelet-Activating Factor and Tumour Necrosis Factor*. Am J Pathol, 151(2):557–563, 1997.
- [138] MORALES-RUIZ, M., D. FULTON, G. SOWA, L. R. LANGUINO, Y. FUJIO, K. WALSH und W. C. SESSA: *Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt*. Circ. Res., 86(8):892–896, 2000.
- [139] MOULTON, K. S., R. J. MELDER, V. R. DHARNIDHARKA, J. HARDIN-YOUNG, R. K. JAIN und D. M. BRISCOE: *Angiogenesis in the huPBL-SCID model of human transplant rejection*. Transplantation, 67(12):1626–1631, 1999.
- [140] MUELLER-KLIESER, W.: *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications*. Am. J. Physiol, 273(4 Pt 1):C1109–C1123, 1997.
- [141] MURATA, T., S. HE und M. HANGAI: *PPAR-Ligands inhibit Choroidal Neovascularization*. Invest Ophtalmol Vis Sci, 41:2309–2317, 2000.
- [142] NEUFELD, G., T. COHEN, S. GENGRINOVITCH und Z. POLTORAK: *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J., 13(1):9–22, 1999.
- [143] NOELLE, R. und E. C. SNOW: *T helper cells*. Curr Opin Immunol., 4(3):333–337, 1992.
- [144] NOTARANGELO, L. D. und M. C. PEITSCH: *CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper- IgM syndrome*. Immunol. Today, 17(11):511–516, 1996.
- [145] ODA, N., M. ABE und Y. SATO: *ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3*. J. Cell Physiol, 178(2):121–132, 1999.
- [146] OKADA, T., L. SAKUMA und Y. FUKUI: *Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase*. J. Biol. Chem., 269:3563–3567, 1994.
- [147] OKAMURA, K., Y. SATO, T. MATSUDA, R. HAMANAKA, M. ONO, K. KOHNO und M. KUWANO: *Endogenous basic fibroblast growth factor-dependent induction of collagenase and interleukin-6 in tumor necrosis factor-treated human microvascular endothelial cells*. J. Biol. Chem., 266(29):19162–19165, 1991.
- [148] ONO, M., H. TORISU, J. FUKUSHI, A. NISHIE und M. KUWANO: *Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis*. Cancer Chemother. Pharmacol., 43 Suppl:S69–S71, 1999.
- [149] PANAYI, G. S., J. S. LANCHBURY und G. H. KINGSLEY: *The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., 35(7):729–735, 1992.
- [150] PARENTI, A., L. MORBIDELLI, X. L. CUI, J. G. DOUGLAS, J. D. HOOD, H. J. GRANGER, F. LEDDA und M. ZICHE: *Nitric oxide is an upstream signal of vas-*

- cular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J. Biol. Chem.*, 273(7):4220–4226, 1998.
- [151] PARK, H. Y., H. M. KWON, H. J. LIM, B. K. HONG, J. Y. LEE, B. E. PARK, Y. JANG, S. Y. CHO und H. S. KIM: *Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro.* *Exp. Mol. Med.*, 33(2):95–102, 2001.
 - [152] PATTERSON, C., M. A. PERRELLA, W. O. ENDEGE, M. YOSHIKAWA, M. E. LEE und E. HABER: *Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells.* *J. Clin. Invest.*, 98(2):490–496, 1996.
 - [153] PAULI, S., B. EHLIN-HENRIKSSON und H. MELLSTEDT: *A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes.* *Cancer Immunol Immunother*, 20:23–28, 1985.
 - [154] PEPPER, M. S., N. FERRARA, L. ORCI und R. MONTESANO: *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181(2):902–906, 1991.
 - [155] POBER, J. S. und R. S. COTRAN: *Cytokines and endothelial cell biology.* *Physiol Rev*, 70(2):427–451, 1990.
 - [156] POSTLETHWAITE, A. E. und J. M. SEYER: *Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and a synthetic TNF-alpha 31-68 peptide.* *J. Exp. Med.*, 172(6):1749–1756, 1990.
 - [157] PURKERSON, J. M. und D. C. PARKER: *Differential coupling of membrane Ig and CD40 to the extracellularly regulated kinase signaling pathway.* *J Immunol.*, 160(5):2121–2129, 1998.
 - [158] RENNER, D.: *Biomathematik.* VCH Verlags-GmbH Weinheim, 1985.
 - [159] RICOTE, M., J. T. HUANG, J. S. WELCH und C. K. GLASS: *The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function.* *J. Leukoc. Biol.*, 66(5):733–739, 1999.
 - [160] RIEUSSET, J., J. AUWERX und H. VIDAL: *Regulation of gene expression by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma with rosiglitazone (BRL 49653) in human adipocytes.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265(1):265–271, 1999.
 - [161] RIKITAKE, Y., S. KAWASHIMA, T. YAMASHITA, T. UHEYAMA, S. ISHIDO, H. HOTTA, KI HIRATA und M. YOKOYAMA: *Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway.* *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20(4):1006–1012, 2000.

- [162] RING, B. D., S. SCULLY, C. R. DAVIS, M. B. BAKER, M. J. CULLEN, M. A. PELLEYMOUNTER und D. M. DANILENKO: *Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice*. Endocrinology, 141(1):446–449, 2000.
- [163] RINK, L. und H. KIRCHNER: *Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field*. Int. Arch. Allergy Immunol., 111(3):199–209, 1996.
- [164] RISAU, W.: *Angiogenic Growth Factors*. Progress in Growth Factor Research, 2:71–79, 1990.
- [165] RISAU, W., H. SARIOLA, H. G. ZERWES, J. SASSE, P. EKBLOM, R. KEMLER und T. DOETSCHMAN: *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies*. Development, 102(3):471–478, 1988.
- [166] ROUSSEAU, S., F. HOULE, H. KOTANIDES, L. WITTE, J. WALTENBERGER, J. LANDRY und J. HUOT: *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase*. J. Biol. Chem., 275(14):10661–10672, 2000.
- [167] ROUSSEAU, S., F. HOULE, J. LANDRY und J. HUOT: *p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells*. Oncogene, 15(18):2169–2177, 1997.
- [168] SAKAMOTO, T.: *Vitamin E succinate inhibits proliferation and migration of retinal pigmented epithelial cells in vitro: therapeutic implication for proliferative vitroretinopathy*. Graefes Arch Clin Exp Ophtalmol, 234:186–192, 1996.
- [169] SAKSELA, O., D. MOSCATELLI und D. B. RIFKIN: *The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells*. J. Cell Biol., 105(2):957–963, 1987.
- [170] SARRAF, P., E. MUELLER, D. JONES, F. J. KING, D. J. DEANGELO, J. B. PARTRIDGE, S. A. HOLDEN, L. B. CHEN, S. SINGER, C. FLETCHER und B. M. SPIEGELMAN: *Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma*. Nat. Med., 4(9):1046–1052, 1998.
- [171] SATOH, T., K. FURUTA, M. SUZUKI und Y. WATANABE: *Prostaglandin J2 and its metabolites promote neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 258(1):50–53, 1999.
- [172] SCHMIDT, R. F. und G. THEWS: *Physiologie des Menschen*. 26. Auflage Auflage, 1995.
- [173] SCHOTT, R. J. und L. A. MORROW: *Growth factors and angiogenesis*. Cardio-vasc. Res., 27(7):1155–1161, 1993.

- [174] SEETHARAM, L., N. GOTOH, Y. MARU, G. NEUFELD, S. YAMAGUCHI und M. SHIBUYA: *A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF*. *Oncogene*, 10(1):135–147, 1995.
- [175] SENGER, D. R., S. J. GALLI, A. M. DVORAK, C. A. PERRUZZI, V. S. HARVEY und H. F. DVORAK: *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. *Science*, 219(4587):983–985, 1983.
- [176] SEYMOUR, L. W., M. A. SHOAIBI, A. MARTIN, A. AHMED, P. ELVIN, D. J. KERR und M. J. WAKELAM: *Vascular endothelial growth factor stimulates protein kinase C- dependent phospholipase D activity in endothelial cells*. *Lab Invest*, 75(3):427–437, 1996.
- [177] SHALABY, F., J. ROSSANT, T. P. YAMAGUCHI, M. GERTSENSTEIN, X. F. WU, M. L. BREITMAN und A. C. SCHUH: *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. *Nature*, 376(6535):62–66, 1995.
- [178] SHIBUYA, M., S. YAMAGUCHI, A. YAMANE, T. IKEDA, A. TOJO, H. MATSUSHIME und M. SATO: *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*. *Oncogene*, 5(4):519–524, 1990.
- [179] SHIZUKUDA, Y., S. TANG, R. YOKOTA und J. A. WARE: *Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity*. *Circ. Res.*, 85(3):247–256, 1999.
- [180] SIERRA-HONIGMANN, M. R., A. K. NATH und C. MURAKAMI: *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. *Science*, 281:1683–1686, 1998.
- [181] SINHA, M. K., J. P. OHANNESIAN und M. C. HEIMAN: *Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non insulin-dependent diabetic subjects*. *J. Clin. Invest.*, 97:1344–1347, 1996.
- [182] SINHA, M. K., I. OPENTANOVA, J. P. OHANNESIAN, J. W. KOLACZYNSKI, M. L. HEIMAN, J. HALE, G. W. BECKER, R. R. BOWSER, T. W. STEPHENS und J. F. CARO: *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. *J. Clin. Invest*, 98(6):1277–1282, 1996.
- [183] SLIEKER, L. J., K. W. SLOOP, P. L. SURFACE, A. KRIAUCIUNAS, F. LAQUIER, J. MANETTA, J. BUE-VALLESKEY und T. W. STEPHENS: *Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP*. *J. Biol. Chem.*, 271(10):5301–5304, 1996.
- [184] SLUPSKY, C. M., L. N. GENTILE und L. W. DONALDSON: *Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:12129–12134, 1998.
- [185] SPENCER, C. M. und A. MARKHAM: *Troglitazone*. *Drugs*, 54(1):89–101, 1997.

- [186] SPIEGELMAN, B. M.: *PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor*. Diabetes, 47(4):507–514, 1998.
- [187] STASIA, M. J., A. JOUAN, N. BOURMEYSTER, P. BOQUET und P. V. VIGNAIS: *ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of Clostridium botulinum and effect on the cell motility*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180(2):615–622, 1991.
- [188] STETLER-STEVENSON, W. G.: *Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention*. J. Clin. Invest, 103(9):1237–1241, 1999.
- [189] STOUT, R. D. und J. SUTTLES: *The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses*. Immunol. Today, 17(10):487–492, 1996.
- [190] SULLIVAN, G. W., I. J. SAREMBOCK und J. LINDEN: *The role of inflammation in vascular diseases*. J. Leukoc. Biol., 67(5):591–602, 2000.
- [191] SUNDERKOTTER, C. M.: *Macrophage-derived angiogenic factors*. Pharmac Ther, 51:195–216, 1991.
- [192] TAKAHASHI, T. und M. SHIBUYA: *The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts*. Oncogene, 14(17):2079–2089, 1997.
- [193] TAKAHASHI, Y., Y. OKIMURA, I. MIZUNO, K. IIDA, T. TAKAHASHI, H. KAJI, H. ABE und K. CHIHARA: *Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells*. J. Biol. Chem., 272(20):12897–12900, 1997.
- [194] TANABE, K., S. OKUYA, Y. TANIZAWA, A. MATSUTANI und Y. OKA: *Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 241(3):765–768, 1997.
- [195] TANAKA, K., M. ABE und Y. SATO: *Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis*. Jpn. J. Cancer Res., 90(6):647–654, 1999.
- [196] TARTAGLIA, L. A.: *The leptin receptor*. J. Biol. Chem., 272(10):6093–6096, 1997.
- [197] TARTAGLIA, L. A., M. DEMBSKI, X. WENG, N. DENG, J. CULPEPPER, R. DEVOS, G. J. RICHARDS, L. A. CAMPFIELD, F. T. CLARK, J. DEEDS und .: *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 83(7):1263–1271, 1995.
- [198] TERMAN, B. I., M. E. CARRION, E. KOVACS, B. A. RASMUSSEN, R. L. EDDY und T. B. SHOWS: *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 6(9):1677–1683, 1991.
- [199] TERMAN, B. I., M. DOUGHER-VERMAZEN, M. E. CARRION, D. DIMITROV, D. C. ARMELLINO, D. GOSPODAROWICZ und P. BOHLEN: *Identification of the*

- KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 187(3):1579–1586, 1992.
- [200] THURBERG, B. L. und T. COLLINS: *The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis.* Curr. Opin. Lipidol., 9(5):387–396, 1998.
 - [201] TONTONOS, P., E. HU und B. M. SPIEGELMAN: *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid- activated transcription factor.* Cell, 79(7):1147–1156, 1994.
 - [202] UCKAYA, G., M. OZATA, A. SONMEZ, C. KINALP, T. EYILETEN, N. BINGOL, B. KOC, F. KOCABALKAN und I. C. OZDEMIR: *Is leptin associated with hypertensive retinopathy?* J. Clin. Endocrinol. Metab, 85(2):683–687, 2000.
 - [203] UNEMORI, E. N., N. FERRARA, E. A. BAUER und E. P. AMENTO: *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells.* J. Cell Physiol, 153(3):557–562, 1992.
 - [204] VOS, P. DE, A. M. LEFEBVRE, S. G. MILLER, M. GUERRE-MILLO, K. WONG, R. SALADIN, L. G. HAMANN, B. STAELS, M. R. BRIGGS und J. AUWERX: *Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* J. Clin. Invest, 98(4):1004–1009, 1996.
 - [205] VRIES, C. DE: *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for VEGF.* Science, 255:989–991, 1992.
 - [206] WALTENBERGER, J., L. CLAESSON-WELSH, A. SIEGBAHN, M. SHIBUYA und C. H. HELDIN: *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor.* J. Biol. Chem., 269(43):26988–26995, 1994.
 - [207] WALTENBERGER, J., U. MAYR, S. PENTZ und V. HOMBACH: *Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia.* Circulation, 94(7):1647–1654, 1996.
 - [208] WENNSTROM, S., P. HAWKINS, F. COOKE, K. HARA, K. YONEZAWA, M. KASUGA, T. JACKSON, L. CLAESSON-WELSH und L. STEPHENS: *Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling.* Curr. Biol., 4(5):385–393, 1994.
 - [209] WHITE, D. W., K. K. KUROPATWINSKI, R. DEVOS, H. BAUMANN und L. A. TARTAGLIA: *Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization.* J. Biol. Chem., 272(7):4065–4071, 1997.
 - [210] WHITE, D. W. und L. A. TARTAGLIA: *Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor.* Cytokine Growth Factor Rev, 7(4):303–309, 1996.

- [211] WIEGMANN, K., S. SCHUTZE, E. KAMPEN, A. HIMMLER, T. MACHLEIDT und M. KRONKE: *Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades*. J. Biol. Chem., 267(25):17997–18001, 1992.
- [212] WILLSON, T. M., P. J. BROWN, D. D. STERNBACH und B. R. HENKE: *The PPARs: from orphan receptors to drug discovery*. J. Med. Chem., 43(4):527–550, 2000.
- [213] WILLSON, T. M., J. E. COBB, D. J. COWAN, R. W. WIETHE, I. D. CORREA, S. R. PRAKASH, K. D. BECK, L. B. MOORE, S. A. KLIEWER und J. M. LEHMANN: *The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones*. J. Med. Chem., 39(3):665–668, 1996.
- [214] WOLF, G., A. HAMANN, D. C. HAN, U. HELMCHEN, F. THAISS, F. N. ZIYADEH und R. A. STAHL: *Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]*. Kidney Int., 56(3):860–872, 1999.
- [215] WYMAN, M. P., G. BULGARELLI-LEVA und M. J. ZVELEBIL: *Wortmannin inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*. Mol. Cell. Biol., 16:1722–1733, 1996.
- [216] XIN, X., S. YANG, J. KOWALSKI und M. E. GERRITSEN: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo*. J. Biol. Chem., 274(13):9116–9121, 1999.
- [217] YELLIN, M. J., J. BRETT, D. BAUM, A. MATSUSHIMA, M. SZABOLCS, D. STERN und L. CHES: *Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals*. J Exp Med., 182(6):1857–1864, 1995.
- [218] YOSHIDA, A., B. ANAND-APTE und B. R. ZETTER: *Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor*. Growth Factors, 13(1-2):57–64, 1996.
- [219] YURCHENCO, P. D. und J. C. SCHITTNY: *Molecular architecture of basement membranes*. FASEB J., 4(6):1577–1590, 1990.
- [220] ZENG, H., H. F. DVORAK und D. MUKHOPADHYAY: *Vascular Permeability Factor (VPF)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 Downmodulates VPF/VEGF Receptor-2-mediated Endothelial Cell Proliferation, but Not Migration, through Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathways*. J. Biol. Chem., 276(29):26969–26979, 2001.
- [221] ZENG, H., S. SANYAL und D. MUKHOPADHYAY: *Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for VPF/VEGF-induced endothelium migration and proliferation respectively*. J. Biol. Chem., 2001.

- [222] ZHANG, F., M. B. BASINSKI, J. M. BEALS, S. L. BRIGGS, L. M. CHURGAY, D. K. CLAWSON, R. D. DIMARCHI, T. C. FURMAN, J. E. HALE, H. M. HSIUNG, B. E. SCHONER, D. P. SMITH, X. Y. ZHANG, J. P. WERY und R. W. SCHEVITZ: *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature, 387(6629):206–209, 1997.
- [223] ZHANG, Y., W. J. CLIFF, G. I. SCHOEFL und G. HIGGINS: *Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis*. Am J Pathol, 143(1):164–172, 1993.
- [224] ZHANG, Y., R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD und J. M. FRIEDMAN: *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 372(6505):425–432, 1994.
- [225] ZICHE, M., L. MORBIDELLI, R. CHOUDHURI, H. T. ZHANG, S. DONNINI, H. J. GRANGER und R. BICKNELL: *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis*. J. Clin. Invest, 99(11):2625–2634, 1997.
- [226] ZIMMET, P., E. J. BOYKO, G. R. COLLIER und DE COURT: *Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 892:25–44, 1999.

Lebenslauf

Name: Anne Bungenstock

Geburtsdatum: 15.12.1975

Geburtsort: Xanten

Eltern: Erich Bungenstock,
Realschullehrer
Christine Bungenstock,
geb. Eberhard,
Realschullehrerin

Ausbildung: 1982-1986 Grundschule Birten

1986-1995 Städtisches Stiftsgymnasium Xanten
mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der FU Berlin
mit Ablegen des Zweiten Teils der Ärztlichen Prüfung

Oktober 2001 Beginn des Praktischen Jahres

Herbst 2002 Ablegen des Dritten Abschnitts
der Ärztlichen Prüfung

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Anne Bungenstock